



LUIZ GUILHERME SCHMIDT CASTELLANI

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO
PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO
Mycobacterium tuberculosis A FÁRMACOS CONTRA
TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Espírito Santo,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C348d Castellani, Luiz Guilherme Schmidt, 1987-
Desenvolvimento e padronização de um método para
determinação da sensibilidade do mycobacterium tuberculosis a
fármacos contra tuberculose / Luiz Guilherme Schmidt Castellani. –
2013.
117 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Escarros. 3. Testes de
sensibilidade bacteriana. I. Palaci, Moisés. II. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando LUIZ GUILHERME SCHMIDT CASTELLANI apresentou a dissertação intitulada “Desenvolvimento e padronização de um método para determinação da sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* a fármacos contra tuberculose” em sessão pública, no dia 22 de agosto de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar o farmacêutico LUIZ GUILHERME SCHMIDT CASTELLANI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 22 de agosto de 2013

Profa. Dra. Martha Maria de Oliveira
(Membro Externo)

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)

Prof. Dr. Moisés Palaci
(Orientador)

A todas as pessoas que estão ou que um dia possam vir a estar com tuberculose. É motivado por vocês que todos os dias eu me empenho de coração para realizar o meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu divino pai de amor, que considero meu pilar central de sustentação, no qual eu me apoio para enfrentar todos os meus medos e inseguranças, e no qual eu deposito toda a minha esperança para usufruir da maior bênção que me destes, a vida;

Aos meus mentores e guias espirituais, que por toda a minha vida me orientaram no caminho da justiça, do amor e da caridade, e sempre estiveram ao meu lado para acalmar e confortar a minha alma nos momentos de dor;

Aos meus queridos pais, Eliana Schmidt Castellani e Paulo Cesar Drumond Castellani, que desde o momento da minha concepção, sempre me dedicaram o mais puro amor, o amor incondicional. Mesmo que tenhamos passado por momentos de turbulência, vocês nunca deixaram de estar ao meu lado e de me desejar o melhor. Não tenho palavras para dizer o quão importante vocês dois são para mim;

Aos meus irmãos, Carlos Eduardo Schmidt Castellani e Paulo Henrique Schmidt Castellani, em quem eu sempre me espelhei para progredir no caminho da pesquisa científica;

À toda a minha família, que sempre me encorajaram a perseguir os meus sonhos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moisés Palaci, pela orientação e pela oportunidade de desenvolver todo o trabalho que originou esta dissertação de mestrado;

À Solange Alves Vinhas, por abrir as portas e me receber no Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES. Graças a você eu pude dar o meu primeiro passo (e vários outros depois) no ramo da pesquisa científica. Serei eternamente grato;

À Renata Lyrio Peres Nóbrega, por sempre estar disposta a me ajudar no laboratório quando precisei, e mais importante, por ter sido a primeira pessoa a me apresentar o

universo das Micobactérias, quando me deu aula na disciplina de microbiologia, durante o meu curso de Farmácia. Graças à simpatia que você transmitiu na sua aula, eu me animei a ir à entrevista com a Solange para tentar a iniciação científica;

Ao Pedro Sousa de Almeida Júnior, a.k.a. DJ Pedro Campana, mais do que um colega de trabalho, um verdadeiro amigo. Você não tem noção do quanto eu te admiro. Acho incrível como que duas pessoas tão diferentes conseguem trabalhar tão bem juntas, e venhamos e convenhamos, ninguém arruma o laboratório como a gente; :)

À Tatiana de Resende Có Pelição, por sempre acreditar no meu potencial e confiar no meu trabalho;

À Maria José Chiabai, minha querida colega de mestrado e companheira de laboratório, por todos os conselhos e merecidos puxões de orelha, pois me faziam despertar das minhas fantasiosas ilusões;

À Hildete Nunes, por me treinar (e me aguentar) durante todos esses anos. Nem sei expressar o quanto eu aprendi com você, querida amiga;

Aos colegas de trabalho, Fabíola Ribeiro, Laudicéia, João Batista, e Leduc Mageski, pelo apoio que me deram durante todo o tempo que estive no NDI;

Aos membros da minha banca examinadora, Profa. Dra. Martha Maria de Oliveira e Profa. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes, por terem aceitado o convite para a minha defesa de dissertação;

A todos os meus amigos da Comunidade Espírita Jardim da Penha e da Associação Médico-Espírita do Estado do Espírito Santo pelo carinho e incentivo durante essa jornada;

“Aqueles que não aprendem com a história estão condenados a repeti-la.”
(George Santayana)

RESUMO

A resistência a fármacos antituberculose tem constituído uma grande ameaça ao controle da tuberculose em âmbito mundial. A sua detecção precoce permite ao médico instituir um esquema de tratamento mais adequado ao paciente e consequentemente quebrar a cadeia de transmissão dos bacilos. Os testes de sensibilidade a antimicrobianos atuais, embora eficientes, são caros e/ou demorados e/ou trabalhosos. Com base nesta premissa, nos propusemos a desenvolver e padronizar um método fenotípico direto para determinação da sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* a antimicrobianos de primeira linha do tratamento da tuberculose. Para o desenvolvimento deste novo teste, utilizaram-se os princípios do método das proporções e do exame de cultura pelo método de Ogawa–Kudoh. O estudo foi dividido em duas fases. A primeira, caracterizada pelo desenvolvimento e padronização do método proposto e a segunda, pela análise da concordância entre o método desenvolvido e o método do MGIT (padrão-ouro). Na primeira fase, foram realizados diversos ensaios para definir: os volumes de absorção e de liberação de líquidos de diferentes tipos de swab, o meio de cultura, as concentrações dos antimicrobianos e o tempo de leitura/interpretação das culturas. Além disso, foi verificado se a amostra deveria ou não ser diluída. Com base nos resultados destes ensaios, padronizou-se o método com: swab comercial, em meio de cultura Ogawa-Kudoh contendo separadamente 0,2 µg/mL de isoniazida, 40,0 µg/mL de rifampicina, 10,0 µg/mL de estreptomicina e 500,0 µg/mL de ácido para-nitrobenzóico. Padronizou-se ainda a inoculação da amostra de escarro de forma direta, ou seja, sem diluir e a leitura/interpretação do resultado do teste no período entre 21 e 28 dias. A análise comparativa entre este método e o teste de sensibilidade a antimicrobianos no sistema MGIT realizada na segunda fase do projeto indicou um índice kappa igual a 1,000, ou seja, uma concordância muito boa em relação ao padrão-ouro. Diante desses resultados promissores, acreditamos que o método desenvolvido apresente um grande potencial para ser utilizado em laboratórios com pouca infra-estrutura, por ser de baixo custo, fácil execução e relativamente rápido.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, escarros, antimicrobianos, testes de sensibilidade bacteriana, resistência a drogas.

ABSTRACT

Drug resistance has become a worldwide threat to tuberculosis control. Its early detection allows the doctor to use more appropriate treatment regimens and thereafter to break the transmission chain of the bacilli. Current drug susceptibility tests, though efficient, are expensive and/or lengthy and/or laborious. Based on that premise, we proposed to develop and standardize a direct phenotypic method to determinate the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first line drugs used on tuberculosis treatment. To develop this new method, it was used the principles of the proportion method and the Ogawa-Kudoh swab culture method. The study was divided in two phases. The first was characterized by the development and standardization of the proposed method and the second by analyzing the agreement between the developed method and the MGIT method (gold standard). In the first phase, several assays were realized to define: the absorption and liberation volumes of liquids from different kinds of swab, the culture medium, the drugs concentrations and the time to read/interpret the cultures. Besides, it was verified if the sample should or should not be diluted. Based on results, the method was standardized with: commercial swab, Ogawa-Kudoh culture medium containing separately 0,2 µg/mL of isoniazid, 40,0 µg/mL of rifampicin, 10,0 µg/mL of streptomycin e 500,0 µg/mL of para-nitrobenzoic acid. It was also standardized that the sample should not be diluted and the cultures should be read/interpreted between 21 and 28 days. The comparative analyzes between this method and the susceptibility test on MGIT system indicated a kappa index equal to 1,000, which means a perfect agreement to gold standard. Given these promising results, we believe that the developed method presents a great potential to be used in laboratories with little infrastructure, because of its low cost, it is easy to perform and relatively fast.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, sputum, anti-infective agents, microbial sensitivity tests, drug resistance.

SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	do inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	do inglês “ <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ”
cm	centímetro
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade Óptica
d.p.	Desvio Padrão
EMB	Etambutol
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FRET	do inglês “ <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ”
g	grama
HIV	do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
<i>hsp65</i>	do inglês “ <i>heat-shock protein 65 gene</i> ”
INH	Isoniazida
L-J	Löwenstein-Jensen
m	massa
MDR-TB	Tuberculose Multidroga-resistente
mg	miligrama
MGIT	do inglês “ <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> ”
min	minuto
mL	mililitros
MNT	Micobactérias não causadoras de Tuberculose
MODS	do inglês “ <i>microscopic-observation drug-susceptibility</i> ”
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Nº	número
NaCl	Cloreto de Sódio
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOH	Hidróxido de Sódio

NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
nm	nanômetro
O-K	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Ogawa-Kudoh modificado
PAS	ácido para-aminossalicílico
PCR	do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
pH	<i>Potencial de hidrogênio iônico</i>
PNB	ácido para-nitrobenzóico
PRA-hsp65	do inglês “PCR-restriction enzyme analysis”
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
rpoB	do inglês “ <i>RNA polymerase B' subunit gene</i> ”
s	segundo
SM	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TCH	hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico
TDR-TB	Tuberculose Totalmente Resistente a Drogas
TSA	Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
v	volume
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente a Drogas
XXDR-TB	Tuberculose Extremamente Resistente a Drogas
µg	micrograma
µL	microlitros
°C	grau Celsius

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Número estimado de casos de MDR-TB ocorridos entre os casos notificados de TB pulmonar, 2011.....	31
Figura 2: Países que notificaram pelo menos um caso de XDR-TB até o final de 2011.....	33
Figura 3: Fluxograma de seleção das amostras clínicas.....	51
Figura 4: Esquema do teste para seleção do meio de cultura.....	56
Figura 5: Esquema do teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K.....	58
Figura 6: Esquema do teste da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e SM nos meios de cultura.....	60
Figura 7: Esquema do processo de homogeneização da amostra.....	62
Figura 8: Esquema das diluições da amostra de escarro espontâneo.....	62
Figura 9: Esquema do método de Ogawa-Kudoh para exame de cultura.....	63
Figura 10: Esquema das descontaminações e das inoculações.....	64
Figura 11: Esquema do método do MGIT.....	68
Figura 12: Esquema do controle das concentrações dos inóculos do método do MGIT.....	69
Figura 13: Comparação visual entre os dois tipos de swab.....	73
Figura 14: Crescimento do Mtb nos diferentes meios de cultura a base de ovo.....	77

Figura 15: Resultado de um TSA de um isolado de Mtb.....83

Gráfico 1: Curva de crescimento em diferentes meios de cultura a base de ovo realizada a partir de suspensões preparadas em água destilada estéril ou hidróxido de sódio 4% m/v.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação em grupos das drogas anti-TB.....	31
Tabela 2: Volumes iniciais e tempos determinados para cada etapa do teste de absorção dos swabs.....	53
Tabela 3: Composição química dos meios de Löwenstein-Jensen, Ogawa 1%, Ogawa-Kudoh e Ogawa 3%.....	55
Tabela 4: Nome e fabricante dos fármacos anti-TB selecionados.....	57
Tabela 5: Solvente, diluente, concentração estoque, volume adicionado ao meio e concentração final dos antimicrobianos selecionados.....	57
Tabela 6: Composição química dos meios Löwenstein-Jensen, Ogawa-Kudoh modificado e Ogawa-Kudoh.....	60
Tabela 7: Volumes absorvidos pelos diferentes tipos de swab.....	74
Tabela 8: Limite de detecção dos dois tipos de swab.....	75
Tabela 9: Volumes liberados pelos diferentes tipos de swab (números expressos como média \pm desvio-padrão).....	75
Tabela 10: Análise da influência do meio O-K na atividade dos antimicrobianos frente a cepas de referência de Mtb e <i>M. avium</i>	78
Tabela 11: Análise da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura.....	79
Tabela 12: Distribuição dos perfis dos isolados de acordo com os resultados da baciloscopia.....	80

Tabela 13: Influência da diluição no perfil de sensibilidade ou resistência dos isolados de Mtb sensíveis.....	81
---	----

Tabela 14: Influência da diluição no perfil de sensibilidade ou resistência dos isolados de Mtb resistentes.....	82
---	----

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
2.REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1.Histórico	23
2.2.Tratamento	24
2.2.1.A era dos sanatórios	25
2.2.2.A era dos antibióticos	26
2.2.2.1.Década de 1940.....	26
2.2.2.2.Década de 1950.....	27
2.2.2.3.Décadas de 1960 e 1970	28
2.2.2.4.Década de 1980.....	29
2.3.O período da negligência	29
2.4.A pandemia do HIV e o retorno devastador da TB	30
2.5.Resistência bacteriana a drogas	31
2.5.1.MDR-TB.....	32
2.5.2.XDR-TB	34
2.5.2.1.XDR, XXDR ou TDR?	34
2.6.O ressurgimento do interesse científico	36
2.7.Testes de sensibilidade do Mtb a antimicrobianos	38
2.7.1.Métodos genotípicos.....	38
2.7.1.1.Sequenciamento do DNA	39
2.7.1.2.Técnicas de hibridização em fase sólida	39
2.7.1.3.Técnicas de PCR em tempo real	40
2.7.1.4.Xpert MTB/RIF	40
2.7.2.Métodos fenotípicos.....	41
2.7.2.1.Método da concentração absoluta	42
2.7.2.2.Método da razão de resistência	43
2.7.2.3.Método das proporções	43
2.7.2.4.MGIT	44
2.7.2.5.Ensaio baseados em bacteriófagos	44
2.7.2.6.Métodos colorimétricos	45
2.7.2.7.Ensaio da nitrato redutase	46

2.7.2.8.MODS	46
2.8.Justificativa	46
3.OBJETIVOS	48
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1.Estratégia do estudo.....	51
4.1.1.Delineamento	51
4.1.2.Local	51
4.1.3.Desenho.....	51
4.2.Amostras Clínicas.....	51
4.2.1.Critérios de inclusão	52
4.2.2.Critérios de exclusão	52
4.2.3.Fluxograma de seleção.....	52
4.3.Cepas de referência	53
4.4.Padronização do swab	54
4.4.1.Volume absorvido	54
4.4.2.Volume liberado	54
4.5.Padronização do meio de cultura	57
4.5.1.Seleção do meio de cultura.....	57
4.5.2.Análise da atividade dos antimicrobianos no meio O-K.....	58
4.5.2.1.Seleção dos antimicrobianos.....	58
4.5.2.2.Teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K.....	60
4.5.2.3.Teste da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura	61
4.6.Padronização da técnica do TSA proposto	63
4.6.1Homogeneização da amostra	63
4.6.2.Determinação das diluições	63
4.6.3.Descontaminação e inoculação	65
4.6.4.Determinação do tempo de incubação	67
4.6.5.Leitura e interpretação	67
4.6.6.Identificação e determinação da taxa de contaminação	68
4.7.Comparação com o método do MGIT	69
4.7.1.Armazenamento dos isolados.....	69
4.7.2.Método do MGIT	69

4.8.Análises estatísticas	72
4.9.Aspectos éticos	72
5.RESULTADOS	74
5.1.1ªFase: desenvolvimento e padronização	75
5.1.1.Padronização do swab.....	75
5.1.1.1.Volume absorvido	76
5.1.1.2.Volume liberado	76
5.1.2.Padronização do meio de cultura.....	77
5.1.2.1.Seleção do meio de cultura	77
5.1.2.2.Teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K.....	78
5.1.2.3.Análise da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura	80
5.1.3.Padronização da técnica do TSA.....	81
5.1.3.1.Determinação da diluição	82
5.1.3.2.Determinação do tempo de incubação das culturas	85
5.1.3.3.Determinação da taxa de contaminação.....	86
5.2.2ªFase: comparação com o método do MGIT (padrão-ouro)	86
5.2.1.INH.....	86
5.2.2.RIF	87
5.2.3.EMB	87
5.2.4.SM	88
5.2.5.PNB	89
5.2.6.TCH	89
6.DISSCUSSÃO	90
7.CONCLUSÕES	99
8.PERSPECTIVAS.....	102
9.REFERÊNCIAS.....	104

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas e conhecidas da humanidade, porém permanece até hoje considerada uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo, sendo um dos maiores problemas de saúde atual. Responsável por milhões de casos e mortes, a doença afeta desproporcionalmente as pessoas mais pobres, tanto em países de alta, quanto de baixa renda (FLEMING, 1947; DUFFY, 1971; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; ZUMLA *et al.*, 2013).

Doença infecciosa que tipicamente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas que também pode afetar outros órgãos (TB extrapulmonar), ela é transmitida por via aérea quando pessoas doentes com TB pulmonar expõem bactérias, por exemplo, pela tosse. É causada por micobactérias que pertencem a um grupo de espécies geneticamente similares denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*). Dessas, o *M. tuberculosis* (Mtb) é a espécie mais bem conhecida, infectando mais de 1/3 da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; FORRELLAD *et al.*, 2013; FOX *et al.*, 2013).

Em 2011, havia 8,7 milhões de novos casos no mundo e 1,4 milhão de mortes, incluindo 430.000 mortes entre pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A África Subsaariana apresentou os maiores índices de tuberculose per capita, impulsionada principalmente pela epidemia do HIV. Já a Índia e a China, os dois países com o maior número absoluto de casos de TB, relataram, respectivamente, 26% e 12% de todos os casos mundiais. Nos Estados Unidos e países da Europa Ocidental, a maioria dos casos ocorre em residentes estrangeiros e imigrantes recentes de países nos quais a TB é endêmica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; ZUMLA *et al.*, 2013).

O tratamento da TB conta com uma grande variedade de fármacos, que podem ser classificados de acordo com a sua eficácia, experiência de uso e classe farmacológica. Todos os cinco fármacos anti-TB da primeira linha, que compõem os esquemas terapêuticos padrões, são os mais potentes contra o Mtb e os mais bem tolerados pelos pacientes: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e

pirazinamida (PZA) que são administrados por via oral, e estreptomicina (SM) que é injetável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009b).

O esquema para pacientes novos com TB pulmonar ou extrapulmonar (exceto TB meningoencefálica) é dividido em duas fases. Uma fase inicial, com duração de dois meses, denominada “Fase Intensiva”, na qual se faz uso de quatro fármacos associados (INH + RIF + EMB + PZA). Seguida de uma segunda fase, com duração de quatro meses, denominada “Fase de Manutenção”, quando se faz uso de apenas INH e RIF associadas. No caso de pacientes com TB meningoencefálica, o EMB é substituído pela SM (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009b).

A TB é uma doença curável em mais de 90% dos pacientes que aderem a este esquema terapêutico padrão corretamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; ZUMLA *et al.*, 2013). Porém a resistência bacteriana aos antibióticos compromete o sucesso desse tratamento, pois priva um ou mais fármacos de seu efeito apropriado. Mais importante, em longo prazo está o efeito na comunidade em geral, já que as cepas sensíveis são eliminadas e as resistentes persistem. As últimas então se disseminam, levando a um aumento na prevalência de casos de TB resistente (CANETTI, 1963; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; ZUMLA *et al.*, 2013). Essas formas de TB não respondem ao tratamento padrão de seis meses com os fármacos anti-TB da primeira linha e podem levar até dois anos ou mais para tratar com os de segunda linha (ou reservas) que são menos potentes, mais tóxicos e muito mais caros. Apenas o custo médio dos fármacos para o tratamento de pacientes com TB resistente é 50 a 200 vezes maior do que o tratamento de pacientes com TB sensível e o custo com cuidados com paciente são 10 vezes maior ou mais (MA *et al.*, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a).

A resistência aos antibióticos tem constituído uma grande ameaça ao controle da TB, porém sua detecção precoce permite o início de um tratamento adequado, o que tem um impacto no melhor controle da doença (PALOMINO, 2006). Portanto, a determinação da susceptibilidade bacteriana às drogas tem assumido grande importância, sendo pré-requisito essencial para o uso racional de antibióticos e para preservar a eficácia desse importante grupo de substâncias terapêuticas no combate a TB (CANETTI, 1963).

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Se analisado em termos de seu ônus histórico, o Mtb é o patógeno humano mais bem sucedido, pois foi o responsável por inúmeras mortes ao longo de toda a história humana (KATO-MAEDA *et al.*, 2001). Fato este sustentado pela paleomicrobiologia, cujos estudos moleculares claramente evidenciam o bacilo em restos de esqueletos escavados provenientes de sítios arqueológicos (ANASTASIOU e MITCHELL, 2013). E, apesar do caso humano mais antigo confirmado até o momento ter sido em esqueletos de uma mulher e de uma criança datados de 9.000 anos atrás (HERSHKOVITZ *et al.*, 2008), já foram observadas lesões não específicas consistentes com TB em um esqueleto de *Homo erectus* de 500.000 anos de idade (KAPPELMAN *et al.*, 2008), podendo indicar a coexistência em longo prazo de hospedeiro e patógeno.

Considerada uma doença de todos os séculos, mesmo se levarmos em conta apenas a história humana registrada, poderemos observar que os registros históricos estão impregnados de TB (ZUMLA *et al.*, 2009). Provavelmente descrita pela primeira vez em textos Indianos, a TB foi uma doença conhecida pelos sábios da Antiguidade e Hipócrates (460 a.C. – 370 a.C.) já suspeitava de sua natureza contagiosa, quando ainda era denominada de Tísica, proveniente do grego que significava “definindo” (SAKULA, 1982; BLOOM e MURRAY, 1992). Há registros inclusive no Antigo Testamento da Bíblia Sagrada: “O Senhor te ferirá com a tísica e com a febre, e com a quentura, e com o ardor, e com a secura, e com a destruição de sementeiras e com ferrugem; e te perseguirão até que pereças.” (BÍBLIA, Deuteronômio, 28: 22).

Embora seja uma doença mortal que tem atormentado a humanidade por milênios (SAKULA, 1982), por causa de suas variadas formas, ao longo da história foi frequentemente confundida com outras doenças. Além de Tísica (TB pulmonar), vários outros nomes foram utilizados para descrevê-la, como por exemplo: Escrófula (TB ganglionar), *Lupus vulgaris* (TB cutânea) e Doença de Pott (TB óssea) (BLOOM e MURRAY, 1992). Em 1660, John Bunyan, um escritor e pregador cristão inglês, descreveu a TB como “O Capitão entre esses homens de morte” quando as taxas

dessa doença em Londres chegaram a impressionantes 1.000 casos por 100.000 habitantes por ano (ZUMLA, 2011), mais do que os atuais 817 casos por 100.000 habitantes no Camboja, atualmente o país com a maior prevalência de TB no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Em 1679, Franciscus Sylvius deu o primeiro passo para a unificação dos nomes ao descrever os nódulos pulmonares característicos como "tubérculos" (pequenos nós), observando sua evolução para cavidades (úlceras pulmonares). Em 1819, Rene Laënnec, inventor do estetoscópio, deu o passo seguinte ao reconhecer o tubérculo como o fator comum em todas as formas da doença. Mas foi apenas em 1819, que Schönlein batizou-a de "Tuberculose" (SAKULA, 1982; BLOOM e MURRAY, 1992).

Ainda durante o século 19, em meio à devastação na Europa pela "Peste Branca", como a TB ficou conhecida na Grã-Bretanha Vitoriana (devido à perda da cor da pele nos doentes), responsável por 25% de todas as mortes no continente (ZUMLA, 2011), Jean-Antoine Villemin, em 1865, finalmente comprovou com sucesso a sua natureza contagiosa, ao transferir pus e fluidos de humanos e bovinos doentes para coelhos que posteriormente desenvolveram TB (SAKULA, 1982; BLOOM e MURRAY, 1992).

A questão então deixou de ser se a TB era causada por microorganismos e passou a ser qual microorganismo era o causador. Pergunta que foi respondida no dia 24 de março de 1882, quando Robert Koch surpreendeu o mundo ao anunciar a descoberta do bacilo da TB, originalmente denominado *Bacterium tuberculosis* (KOCH, 1882; SAKULA, 1982; BLOOM e MURRAY, 1992; SHINNICK e GOOD, 1994).

Apenas em 1896, com a criação do gênero *Mycobacterium* por Lehmann e Neumann, foi que o bacilo da TB finalmente foi denominado *Mycobacterium tuberculosis* (SHINNICK e GOOD, 1994).

2.2. TRATAMENTO

Uma das principais preocupações na medicina ao longo dos milênios foi a busca de uma cura para a TB (ZUMLA, 2009).

Durante a Idade Média, acreditava-se que os reis da Inglaterra e da França recém-coroados possuíam poderes especiais de cura, o que fez com que o tratamento mais desejado para este mal na época fosse ser tocado por estes reis (BLOOM e MURRAY, 1992).

2.2.1. A era dos sanatórios

Em 1854, Hermann Brehmer foi incitado pela falta de tratamentos eficazes a estabelecer o primeiro sanatório na Europa (BLOOM e MURRAY, 1992). Na ausência de quimioterapia, o banho de sol (helioterapia), o ar puro (aeroterapia), o repouso, a atenção à nutrição e o exercício moderado foram vistos como sendo capazes de contribuir para o sucesso na recuperação da TB por décadas (KNIGHT, 1888; PEARSON, 1928; MARKOE, 1934; BLOOM e MURRAY, 1992; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Esta abordagem criou uma indústria de sanatórios localizados em montanhas, onde os pacientes poderiam receber doses cuidadosamente tituladas de luz solar, alimentação de qualidade, ar fresco, repouso e exercício (DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012). Hoje, sabe-se que uma melhor nutrição e a exposição gradual ao sol podem contribuir para restaurar a deficiência de vitamina D, que é essencial para a função de macrófagos (DINI e BIANCHI, 2012), que o repouso e o exercício moderado podem melhorar a perfusão de áreas do pulmão mais afetadas pela TB cavitária (DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012), e que o ar mais puro pode levar a um aumento da atividade respiratória, o que atua vantajosamente sobre a nutrição do parênquima pulmonar (KNIGHT, 1888).

Além do isolamento dos pacientes em sanatórios, acreditava-se que as terapias de colapso do pulmão, como por exemplo, a cirurgia do nervo frênico (remoção de uma porção do nervo, resultando na paralisia permanente do diafragma) e o pneumotórax artificial (injeção de ar na cavidade pleural para colapsar o pulmão), podiam evitar a propagação e reduzir a toxemia, por restringir o movimento do pulmão, sendo, portanto frequentemente utilizadas (MARKOE, 1934).

2.2.2. A era dos antibióticos

A descoberta de Robert Koch de 1882 abriu o caminho para a reavaliação terapêutica e utilização de uma nova abordagem. Havia agora uma causa direta a ser atacada e o inimigo recém-descoberto certamente provaria ser vulnerável a algum dos potentes agentes químicos que médicos e farmacêuticos tinham para oferecer. Koch se elegeu para liderar o ataque e conduziu experiências com uma variedade de compostos inorgânicos, entre os quais um cianeto duplo de ouro e potássio (KEERS, 1980).

O interesse na auroterapia (tratamento a base de sais de ouro) se generalizou e por um tempo, numerosos sais de ouro foram recomendados para o tratamento da TB, mas sem qualquer prova realmente convincente da eficácia. O período entre 1925-1935 ficou conhecido como a “Década de Ouro”, por testemunhar a fenomenal ascensão constante da auroterapia e também o seu declínio súbito e precipitado, devido ao enorme número de efeitos tóxicos desse tratamento (HART, 1946; KEERS, 1980; MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Em 1935, auxiliado por químicos da Bayer na Alemanha, Gerhard Domagk descobriu as sulfonamidas, o que lhe garantiu mais tarde o Prêmio Nobel de Medicina. Algumas sulfonamidas e seus derivados mostraram ação *in vitro* e *in vivo* contra micobactérias, e o uso de promizole, um derivado da sulfonamida, em nove crianças com TB miliar, geralmente considerada fatal, conduziu à recuperação de seis. Mas as sulfonamidas nunca chegaram a ser amplamente utilizadas no tratamento contra TB (HART, 1946; MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.2.2.1. Década de 1940

A porta para uma quimioterapia anti-TB eficaz só foi aberta em 1944, com a descoberta da SM por Arnold Schatz e Selwyn Waksman, o que levou muitos profissionais de saúde a acreditar que a doença logo seria conquistada (BUSH *et al.*, 1945; CROFTON, 1959; ZUMLA, 2009). Mas a alegria se transformou logo em decepção, quando se verificou que os pacientes tratados com SM frequentemente

recidivavam após uma melhora inicial, devido ao surgimento de bacilos resistentes ao agente (HART, 1946; SADUSK *et al.*, 1948; CROFTON, 1959; ZUMLA, 2009; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

O próximo passo importante foi a combinação da SM com o ácido para-aminossalicílico (PAS), uma droga sintetizada por Jorgen Lehman no mesmo ano da descoberta de Schatz e Waksman. E, apesar da combinação não eliminar o desenvolvimento de resistência, ela o controlou significativamente, como foi comprovado após um ensaio clínico controlado de 5 anos que mostrou 31% de morte em pacientes com monoterapia de SM, 36% com monoterapia de PAS e apenas 19% com a combinação SM + PAS (FOX e SUTHERLAND, 1956; CROFTON, 1959; MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.2.2.2. *Década de 1950*

A primeira revolução no combate a TB surgiu com a INH. Após um ceticismo inicial, a INH provou ser a droga mais eficaz já descoberta e respostas ao tratamento consideradas miraculosas foram entusiasticamente relatadas à imprensa e confirmadas em vários ensaios clínicos. Entretanto, assim como todos os outros fármacos anti-TB, a INH rapidamente desenvolvia resistência se dada em monoterapia. Mas a combinação de INH, SM e PAS demonstrou ser um excelente regime terapêutico, sendo estabelecido como o padrão-ouro para o tratamento anti-TB em 1952 (CROFTON, 1959; MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

A principal incerteza era a duração do tratamento requerida para se garantir uma cura permanente livre de recidivas. 62% dos pacientes com TB pulmonar que faziam um tratamento de 6 meses apresentavam recidivas, 19% após 12 meses de tratamento e 4% com tratamento de 24-36 meses. Em última análise, muitos médicos experientes expressaram a opinião de que pelo menos dois anos de tratamento, ou mesmo tratamento por toda a vida era necessário (MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Antes do final da década de 1950 dois fatos críticos haviam sido então identificados sobre a quimioterapia da TB: o surgimento de resistência a qualquer

droga era uma séria ameaça na presença de monoterapia; e um longo período de tratamento era necessário para se prevenir recidivas (MITCHISON, 2005; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Porém, durante esta década, a pesquisa por agentes anti-TB continuou e um número grande de compostos foi identificado. Esses incluíam a PZA, a qual mais tarde iria contribuir para o tratamento de curta duração, a viomicina, a cicloserina, a terizidona, a canamicina, a amicacina, a capreomicina e as tioamidas (etionamida e protionamida). Enquanto todos esses compostos demonstraram eficácia anti-TB, não foram suficientemente fortes para desafiar o padrão-ouro de INH, SM e PAS, ou suas doses eram limitadas pela existência de toxicidade (DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.2.2.3. Décadas de 1960 e 1970

Em 1961, Laderle deu o próximo passo para uma terapia eficaz ao introduzir o EMB no arsenal quimioterápico contra a TB. Os estudos iniciais encontraram boa eficácia anti-TB, mas toxicidade óptica foi encontrada, a qual demonstrou ser dose relacionada. Consequentemente a dose foi reduzida a um ponto no qual a eficácia do EMB foi severamente comprometida, mas suficiente para, associado a outras drogas, auxiliar na prevenção de resistência. E graças a essa característica em poucos anos o EMB substituiu o PAS no regime terapêutico, reduzindo o tempo de tratamento para 18 meses (MA *et al.*, 2010; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Porém, a segunda revolução terapêutica anti-TB veio apenas com a RIF. Sua excepcional atividade esterilizante e sua moderada atividade bactericida foram marcantes em estudos com animais e brilhantemente confirmadas numa série de ensaios clínicos. O que levou à alteração do regime terapêutico anti-TB no início da década de 1970 para um regime contendo quatro agentes (INH, RIF, EMB e SM), reduzindo sua duração para 9-12 meses (ZUMLA, 2009; MA *et al.*, 2010; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.2.2.4. Década de 1980

Possivelmente o mais interessante dos agentes desenvolvidos na década de 1950 foi a PZA, mas os ensaios clínicos iniciais mostraram hepatotoxicidade, fazendo com que pesquisas adicionais fossem interrompidas (ZHANG e MITCHISON, 2003; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Porém, na década de 1980, seu uso foi reexaminado e quando associada a INH e SM alcançava baixas taxas de recidiva, e quando combinada com INH e RIF as taxas de recidivas após 6 meses de tratamento caíram ainda mais. A confirmação desses achados foi fornecida por estudos adicionais conduzidos em Singapura e Hong Kong, o que culminou com a aceitação do atual regime de tratamento padrão como novo padrão-ouro, no qual a PZA substitui a SM. Este novo esquema trouxe três grandes benefícios ao tratamento da TB: 1) sua duração foi reduzida para apenas 6 meses; 2) passou a ser administrado inteiramente por via oral; 3) consequentemente admissões em hospitais puderam ser evitadas (ZHANG e MITCHISON, 2003; ZUMLA, 2009; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.3. O PERÍODO DA NEGLIGÊNCIA

O tratamento moderno de curta duração, propriamente utilizado, pode alcançar uma cura em torno de 98% dos pacientes, é igualmente eficaz quando dado para pacientes hospitalizados ou em ambulatório e está entre as mais eficazes e custo efetivas de todas as intervenções terapêuticas para uma doença crônica (ZUMLA, 2009; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Mas, infelizmente, esse sucesso foi acompanhado por um período crucial na longa história da TB que ocorreu nos países desenvolvidos entre 1950 e 1990 (em muitos aspectos um período desastroso). Depois que passou a ser uma doença curável e que as taxas de prevalência e incidência despencaram, o interesse na vigilância global a TB quase desapareceu, levando a uma perda de habilidades clínicas, perda de consciência sobre a doença e desmontagem das infraestruturas para seu manejo. A TB deixou de ser considerada uma ameaça aos países

desenvolvidos, portanto o financiamento para as pesquisas diminuíram e importantes centros de pesquisa foram fechados (CROFTON, 1959; ZUMLA, 2009; DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

Paradoxalmente, esse período foi a época em que o tratamento anti-TB altamente eficaz foi introduzido e regimes terapêuticos foram aperfeiçoados. Mas a incompetência da sociedade em controlar a TB foi tão evidente, que depois de mais de 30 anos de desenvolvimento de métodos de cura e prevenção e antes do advento da pandemia do HIV, havia mais casos de TB ativa no mundo do que no início da década de 1950 (ZUMLA, 2009).

Sem dúvida o maior inimigo do controle da TB tem sido a negligência (ZUMLA, 2009).

2.4. A PANDEMIA DO HIV E O RETORNO DEVASTADOR DA TB

Devido à pandemia do HIV, as taxas globais de TB vêm aumentando desde o início da década de 1990. Isso porque os mais de 90% dos dois bilhões de pacientes infectados pelo *Mtb* em todo o mundo, mas que não desenvolveram a doença ativa porque seus sistemas imunológicos contiveram o patógeno numa infecção latente assintomática (TB latente), podem agora ver um despertar da infecção devido ao seu estado imunológico enfraquecido pelo HIV (PASMAN, 2012; ZUMLA *et al.*, 2013).

A TB e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) constituem a principal carga de doenças infecciosas em países pobres. A coinfecção do *Mtb* com o HIV coloca desafios específicos de diagnóstico e terapêutica e exerce uma enorme pressão sobre os sistemas de saúde em países africanos e asiáticos, pois apresentam grandes populações de indivíduos coinfectados. Estima-se que cerca de 14 milhões de pessoas em todo o mundo estão duplamente infectados. (PAWLOWSKI *et al.*, 2012). Nos países da África Subsaariana, cuja prevalência de infecção pelo HIV é maior que 10% na população em geral, as taxas de notificação de TB aumentaram 5% a 10% ao ano na última década, inclusive em países com programas de controle da TB bem estabelecidos (WELLS *et al.*, 2007).

Ambos patógenos potencializam um ao outro, acelerando a deterioração das funções imunológicas e resultando na morte prematura se não tratada. A coinfeção com o HIV é o mais poderoso fator de risco conhecido para a progressão da infecção por *Mtb* a doença ativa, aumentando o risco de reativação da TB latente em 20 vezes. A TB representa cerca de 26% das mortes relacionadas com a AIDS, sendo portanto a maior causa de morte nestes pacientes, pois pode acelerar o curso da infecção pelo HIV, aumentando a carga viral. Além disso, a coinfeção também pode contribuir para o aumento da prevalência de resistência entre pacientes com TB e tem sido associada com muitos surtos de TB resistente (WELLS *et al.*, 2007; PAWLOWSKI *et al.*, 2012).

2.5. RESISTÊNCIA BACTERIANA A DROGAS

Resistência genética a uma droga anti-TB se deve a mutações cromossomais espontâneas em cepas selvagens (cepas que nunca foram expostas a qualquer antibiótico) de *Mtb*, que se tornam cepas selvagens resistentes. Elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons, que são conhecidos por mediar resistência a drogas em várias espécies bacterianas, não o fazem no *Mtb* (VARELDZIS *et al.*, 1994; ZHANG e YEW, 2009).

As cepas selvagens resistentes existem em diferentes frequências para determinadas drogas e quando um esquema poliquimioterápico é realizado adequadamente, as cepas selvagens resistentes a uma droga são mortas pela ação de outra droga. Porém, quando expostas a um esquema terapêutico inadequado (por erro de prescrição médica) ou a um tratamento incompleto (seja por falha no fornecimento dos medicamentos ao paciente ou por não adesão do paciente ao tratamento), serão capazes de sobreviver à terapia, enquanto que os bacilos sensíveis morrerão. Então, resistência a um ou mais fármacos anti-TB surgirá durante o curso do tratamento, caracterizando uma resistência adquirida (VARELDZIS *et al.*, 1994; MITCHISON, 1998; JAIN e DIXIT, 2008; ZHANG e YEW, 2009).

Posteriormente, devido a atrasos no diagnóstico, superpulação e/ou vigilância epidemiológica inadequada, o paciente vai transmitir a doença resistente a outras

peessoas, que desenvolverão uma TB resistente desde o início da infecção, sem nunca terem recebido tratamento anti-TB prévio, o que caracteriza uma resistência primária (VARELDZIS *et al.*, 1994; ZHANG e YEW, 2009).

Os padrões de resistência podem variar amplamente, de um único fármaco a múltiplos fármacos, e são classificados de acordo (PONTALI, MATTEELLI e MIGLIORI, 2013).

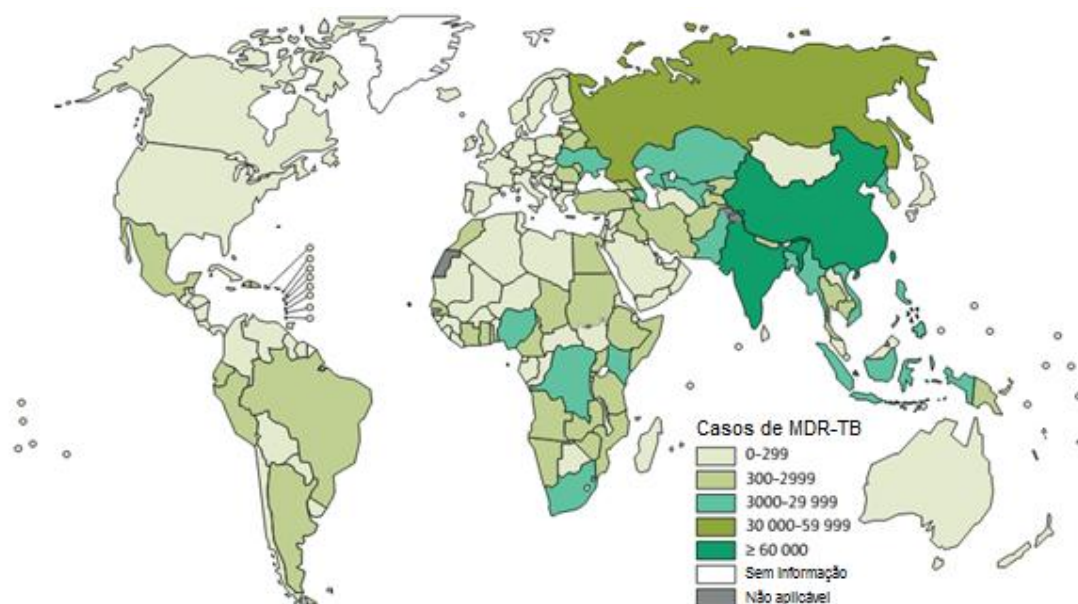
2.5.1. MDR-TB

A TB Multidroga-resistente (MDR-TB) é uma forma da doença causada por bactérias que são resistentes a pelo menos INH e RIF, que são os medicamentos anti-TB mais eficazes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a).

As duas últimas décadas testemunharam o aumento progressivo na proporção dos casos de MDR-TB. No final de 2011, já havia 630 mil casos no mundo (Figura 1), sendo que apenas a China, a Índia e a Rússia contribuíram com quase 60% de todos os casos mundiais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Na Bielorrússia e em outros países da antiga União Soviética, mais de ¼ dos pacientes virgens de tratamento (e bem mais da metade dos previamente tratados) apresentam-se infectados com MDR-TB. A maior prevalência de todos os tempos foi relatada em Minsk (capital da Bielorrússia), onde 35,3% dos novos casos de TB e 76,5% dos previamente tratados albergam cepas causadoras de MDR-TB (SKRAHINA *et al.*, 2012). Além disso, 2/3 de todos os casos de TB diagnosticados nas prisões da Moldávia apresentavam MDR-TB, onde a prevalência estimada excede 570 para cada 100 mil habitantes (JENKINS *et al.*, 2012). No Brasil, em 2011, a carga estimada de MDR-TB foi de 560 (0,91%) casos entre os pacientes com TB virgens de tratamento e de 540 (5,4%) casos entre os previamente tratados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O tratamento para MDR-TB é difícil. Deve-se sempre ser baseado em resultados de Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) e utilizar preferencialmente as drogas dos grupos 1 a 3 (Tabela 1) às quais o isolado apresentar sensibilidade no TSA. Por requer o uso de drogas menos eficazes e mais caras, tóxicas e demoradas, o esquema terapêutico para MDR-TB apresenta

reduzidas taxas de sucesso do tratamento, variando de 36% a 79% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b; PONTALI, MATTEELLI e MIGLIORI, 2013).



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012

Figura 1. Número estimado de casos de MDR-TB ocorridos entre os casos notificados de TB pulmonar, 2011.

Tabela 1. Classificação em grupos das drogas anti-TB

Grupo	Drogas
Grupo 1: agentes orais de primeira linha	INH, RIF, EMB, PZA e rifabutin ^a
Grupo 2: agentes injetáveis	SM, amicacina, canamicina e capreomicina
Grupo 3: fluoroquinolonas	moxifloxacina, levofloxacina, ofloxacina, sparfloxacina e gatifloxacina
Grupo 4: agentes orais bacteriostáticos de segunda linha	PAS, etionamida, protionamida, cicloserina e terizidona
Grupo 5: agentes com eficácia duvidosa	clofazimina, linezolida, amoxicilina/clavulanato, tioacetazona, carbapenems (imipenem/cilastatina, meropenem ^b), altas doses de INH, claritromicina, tioridazina ^b e cotrimazol ^b

^a usado somente quando disponível para administração concomitante com terapia antirretroviral que inclua um inibidor de protease

^b evidência inicial está presentemente disponível

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b

2.5.2. XDR-TB

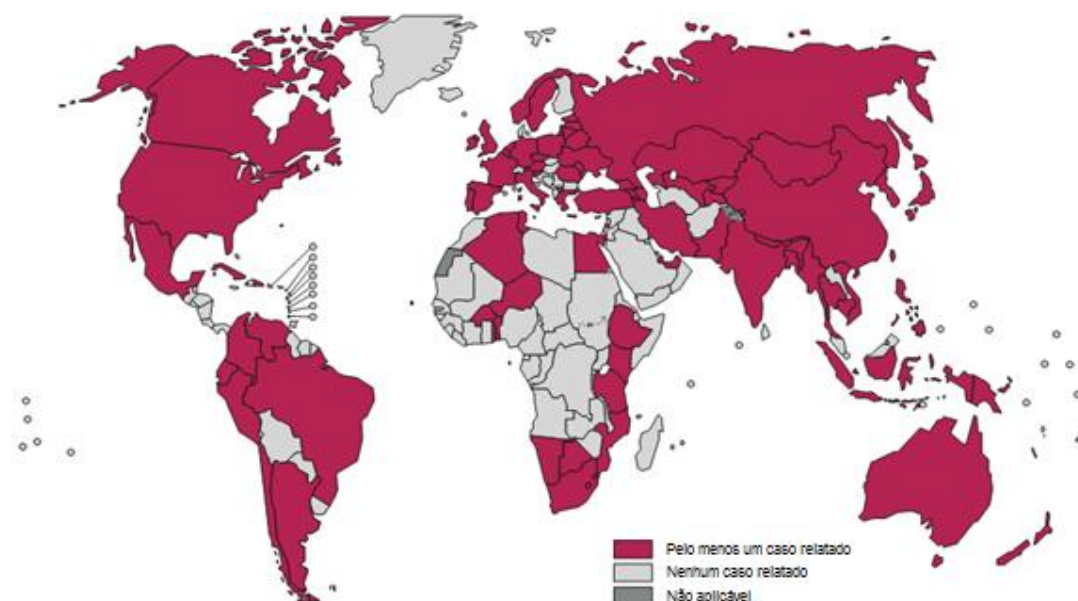
A TB Extensivamente Resistente a Drogas (XDR-TB) é outra forma da doença causada por bactérias que são resistentes a isoniazida e rifampicina, bem como a qualquer fluoroquinolona e a qualquer uma das drogas injetáveis anti-TB da segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a).

O termo XDR-TB foi utilizado pela primeira vez em março de 2006, em um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) em parceria com o CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; MIGLIORI *et al.*, 2007). No final de 2011, 84 países ao redor do mundo já haviam relatado pelo menos um caso de XDR-TB (Figura 2). Mesmo assim, acredita-se que ainda muitos casos nunca foram diagnosticados devido à deficiência na capacidade laboratorial para testar a resistência às drogas da segunda linha de tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Os casos de XDR-TB apresentam as menores taxas de sucesso no tratamento e as maiores taxas de falha, recidiva e morte (PONTALI, MATTEELLI e MIGLIORI, 2013). Uma meta-análise recente demonstrou sucesso de tratamento em apenas 44% dos pacientes, com mortalidade variando de 14 a 27% (JACOBSON *et al.*, 2010).

2.5.2.1. XDR, XXDR ou TDR?

Em 2007, foram relatados pela primeira vez 2 casos na Itália de TB resistente a todas as drogas de primeira (INH, RIF, EMB, PZA e SM) e segunda linha (fluoroquinolonas, etionamida, amicacina, PAS, capreomicina, canamicina e cicloserina) e também a drogas adicionais (rifabutin, clofazimina, dapsona, claritromicina e tiacetazona) (MIGLIORI *et al.*, 2007a,b). A linezolida ainda não estava disponível para testes (MIGLIORI *et al.*, 2012). Frente a tamanha resistência os pesquisadores italianos que fizeram os relatos utilizaram uma nova nomenclatura: TB Extremamente Resistente a Drogas (XXDR-TB) (MIGLIORI *et al.*, 2007a).



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012

Figura 2. Países que notificaram pelo menos um caso de XDR-TB até o final de 2011.

Posteriormente, novos relatos de resistência extrema começaram a surgir. Em 2009, foram relatados 15 casos no Irã de TB resistente a todas as drogas de primeira e segunda linha (VELAYATI *et al.*, 2009). Em dezembro de 2011, foram relatados 4 casos na Índia de TB resistente a todas as drogas de primeira linha e a todas as drogas de segunda linha testadas (ofloxacino, moxifloxacino, canamicina, amicacina, capreomicina, PAS e etionamida) (UDWADIA *et al.*, 2012). Porém, os pesquisadores iranianos e indianos fizeram uso de uma nomenclatura diferente da dos italianos: TB Totalmente Resistente a Drogas (TDR-TB) (VELAYATI *et al.*, 2009; MIGLIORI *et al.*, 2012; UDWADIA *et al.*, 2012).

Como resultado do intenso interesse público gerado por esses episódios, em março de 2012, a OMS convocou 40 especialistas para discutir as implicações de uma nova nomenclatura, se as evidências correntes possibilitariam a definição de um novo padrão de resistência a drogas além da XDR-TB e se uma melhor orientação nas opções de tratamento para esses pacientes era possível. Entretanto, apesar do grupo reconhecer que os pacientes como os descritos acima representem um desafio formidável para os clínicos e para as autoridades de saúde pública, nenhuma definição confiável além de XDR-TB pôde ser proposta. Sem ter uma melhor base de evidências, nenhuma mudança nas diretrizes do planejamento de regimes de tratamento para pacientes com amplo padrão de resistência pôde ser

recomendada. Porém, esta posição pode mudar no futuro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O que se sabe ao certo é que os pacientes portadores de cepas com amplo padrão de resistência, para os quais não há tratamento eficaz, se encontram em uma situação não muito diferente dos pacientes de antes da era dos antibióticos, quando o melhor que se podia oferecer era luz solar e ar fresco. E como consequência, a ideia dos sanatórios vem ressurgindo como um auxiliar na prevenção de uma maior disseminação dessa terrível forma de TB, que aos poucos está recuperando o status de incurável (DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.6. O RESSURGIMENTO DO INTERESSE CIENTÍFICO

Na década 1990, a TB já não podia ser ignorada, principalmente após o reconhecimento da sinergia mortal entre HIV e Mtb. Porém, o renascimento do interesse científico em TB nos países desenvolvidos só ocorreu devido a uma epidemia da doença na cidade de Nova York (EUA), no início da década (ZUMLA, 2009).

A propagação a partir dos marginalizados e carentes para os americanos prósperos de classe média causou temor generalizado para a segurança da população de Nova York. As autoridades da cidade iniciaram uma enorme e dispendiosa campanha para combater a epidemia, e seu sucesso mostrou que, com o investimento e compromisso adequados, a TB podia ser controlada. Mas, mais importante, para aqueles que estavam em posição para influenciar políticas de saúde globais, a epidemia de Nova York destacou a mensagem de que a TB não é restrita aos pobres, aos marginalizados e àqueles em países em desenvolvimento, mas é um problema global do qual nenhuma comunidade ou indivíduo está seguro (ZUMLA, 2009).

Assim, a OMS restabeleceu o seu programa de TB e declarou no dia 24 de março de 1992 – exatamente 110 anos após o anúncio da descoberta de Robert Koch - o Dia Mundial da Tuberculose. Posteriormente, em 1993, numa conferência

intitulada “Tuberculose: de volta ao futuro”, realizada em Londres, a OMS tomou a medida sem precedentes de declarar a TB uma emergência global (ZUMLA, 2009).

No ano 2000, a OMS criou a Parceria para Parar a TB (Stop TB Partnership), um movimento global para acelerar a ação social e política para parar a propagação da TB em todo o mundo. O objetivo da parceria é eliminar a TB como um problema de saúde pública e, em última instância, para garantir um mundo livre de TB. Em 2006, a parceria lançou o Plano Global para Parar a TB 2006-2015 (Global Plan To Stop TB 2006-15). O plano - que prevê um roteiro para ampliação da prevenção, do tratamento, da pesquisa e do desenvolvimento, e para estabelecer o financiamento necessário - atraiu ampla atenção de grandes audiências ao redor do mundo. Importantes personalidades mundiais, como Bill Gates, estiveram presentes no lançamento e pediram aos líderes mundiais que apoiassem o plano, cujas metas incluem: 1) até 2015 reduzir a prevalência das mortes por TB em 50% comparado com as taxas de 1990; 2) até 2050 eliminar a TB como um problema de saúde pública (STOP TB PARTNERSHIP, 2010).

Com a finalidade de alcançar suas metas, o plano tem como objetivos (STOP TB PARTNERSHIP, 2010):

1. Alcançar acesso universal para cuidados de alta qualidade para pacientes com TB;
2. Reduzir o sofrimento humano e ônus socioeconômico associado à TB;
3. Proteger as populações vulneráveis da TB, da coinfeção Mtb/HIV e da TB resistente a drogas;
4. Apoiar o desenvolvimento de novas ferramentas e permitir o seu uso eficaz e a tempo;
5. Proteger e promover os direitos humanos no controle, cuidado e prevenção da TB.

Entre os resultados desejados para 2015, espera-se que já se tenham testes que possam ser usados em unidades de saúde que sejam capazes de detectar resistência a pelo menos as drogas anti-TB de primeira linha (INH, RIF, EMB, PZA e SM), a fim de evitar falha no tratamento e desenvolvimento de resistência adquirida (STOP TB PARTNERSHIP, 2010; WHO, 2010b; MCNERNEY *et al.*, 2012).

Portanto, apesar da enorme tarefa que está diante dos programas e serviços de controle da TB, há esperança de que, com a ajuda dos novos agentes anti-TB em

desenvolvimento e dos esforços renovados pela parceria de pesquisadores e serviços de saúde, a TB poderá ser controlada e finalmente eliminada como um sério problema de saúde (DIACON, VON GROOTE-BIDLINGMAIER e DONALD, 2012).

2.7. TESTES DE SENSIBILIDADE DO MTB A ANTIMICROBIANOS

Os recentes avanços tecnológicos em diagnóstico laboratorial expandiram a lista dos métodos disponíveis para os TSA recomendados pela OMS, que podem reduzir significativamente o atraso do diagnóstico da resistência a drogas de primeira e segunda linha. Métodos rápidos de TSA permitem a formulação oportuna de regimes de tratamento adequados com base nos perfis de resistência dos isolados dos pacientes, o que tem um impacto no melhor controle da doença (PALOMINO, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; JAIN *et al.*, 2011).

Os métodos de TSA podem ser classificados como diretos ou indiretos, e como genotípicos ou fenotípicos. Os métodos diretos são realizados com a amostra clínica do paciente, enquanto que os métodos indiretos são executados a partir dos isolados crescidos na cultura do diagnóstico primário (CANETTI *et al.*, 1963). Já os métodos genotípicos pesquisam por mutações no genoma bacteriano que possam conferir resistência a drogas, enquanto que os métodos fenotípicos avaliam se o microrganismo expressa o fenótipo de resistência (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

Durante os últimos anos, várias novas abordagens têm sido propostas para se detectar rapidamente a resistência a drogas (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

2.7.1. Métodos genotípicos

Os métodos genotípicos procuram por mutações genéticas previamente conhecidas que sabidamente conferem resistência a antibióticos. Eles envolvem dois passos básicos: 1º) uma amplificação do material genético para amplificar seções do genoma do Mtb conhecidas por estarem alteradas em cepas resistentes;

2º) avaliar o produto amplificado a procura de mutações específicas correlacionadas com resistência (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

As vantagens dos métodos genotípicos incluem: podem ser diretos e indiretos; liberam o resultado rapidamente, pois não necessitam esperar o tempo de crescimento do Mtb; possuem um menor risco biológico por não envolver o cultivo do microrganismo; e apresentam a possibilidade de automatização (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

As desvantagens desses métodos são: nem todos os mecanismos de resistência são conhecidos, o que pode resultar em falsos-negativos; requerem profissionais especializados em biologia molecular e em técnicas de PCR (do inglês *polimerase chain reaction*); a sensibilidade dos testes depende da quantidade de DNA presente na amostra; a presença de inibidores na amostra clínica pode levar a resultados falso-negativos; e tendem a necessitar de reagentes e equipamentos de alto custo para serem realizados (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

2.7.1.1. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA de produtos amplificados por PCR apresenta boa acurácia e tem se mostrado confiável. É considerado o padrão-ouro para detecção de mutações (VICTOR e VAN HELDEN, 2001). Porém, seria bastante difícil de ser implementado em uma rotina laboratorial para detecção de resistência a várias drogas, porque envolveria várias reações para cada isolado, fazendo com que o custo fosse muito alto (HAZBON, 2004).

2.7.1.2. Técnicas de Hibridização em Fase-Sólida

Existem três técnicas comercialmente disponíveis de hibridização em fase-sólida para detecção de resistência a drogas anti-TB: o INNO-LiPA Rif. TB® (Innogenetics, Ghent, Belgium) para detecção de resistência a RIF (MORGAN *et al.*, 2005); o GenoType MTBDR*plus* (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) para a detecção simultânea de resistência a INH e RIF (BWANGA *et al.*, 2009); e o GenoType MTBDRs/ (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) para a detecção simultânea de resistência a fluoroquinolonas, a aminoglicosídeos e ao EMB (FENG

et al., 2013). Esses métodos podem ser realizados com colônias crescidas em meio de cultura ou diretamente com amostras clínicas e se baseiam na hibridização do DNA amplificado a sondas imobilizadas em uma fita de nitrocelulose. Cada sonda representa uma região do genoma micobacteriano conhecida por possuir mutações em cepas resistentes a determinado antibiótico (MORGAN *et al.*, 2005; BWANGA *et al.*, 2009; FENG *et al.*, 2013).

2.7.1.3. Técnicas de PCR em Tempo Real

Técnicas de PCR em tempo real também já foram introduzidas para a detecção rápida de resistência a drogas. Diferentes sondas tem sido usadas como a sonda TaqMan (ESPASA *et al.*, 2005), sondas FRET (do inglês *fluorescence resonance energy transfer*) (SARIBAS *et al.*, 2005), *molecular beacons* (PIATEK *et al.*, 1998; VARMA-BASIL *et al.*, 2004) e *biprobos* (EDWARDS *et al.*, 2001). As principais vantagens das técnicas de PCR em tempo real são a velocidade do teste e o baixo risco de contaminação. As principais desvantagens seriam a requisição de reagentes e equipamentos caros, e a necessidade de profissionais especializados (PALOMINO, 2006).

2.7.1.4. Xpert MTB/RIF

Um avanço importante ocorreu recentemente via o sistema Xpert MTB/RIF (Cepheid), cuja excelente eficácia tem estado bem documentada na literatura (BANADA *et al.*, 2010; BLAKEMORE *et al.*, 2010; BOEHME *et al.*, 2010; HELB *et al.*, 2010; VAN RIE *et al.*, 2010; MELZER, 2011) e cujo uso tem sido endossado pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). O PCR do sistema Xpert MTB/RIF amplifica sequências únicas do Mtb e detecta mutações via *molecular beacons* e a informação é obtida como fluorescência em tempo real. Esse teste já está disponível para aplicação e faz melhorias significantes no diagnóstico da TB (JAIN *et al.*, 2011).

Além de ser de fácil execução, em apenas 2 horas, o Xpert MTB/RIF simultaneamente fornece o diagnóstico de TB e de resistência a RIF, que é um indicador de MDR-TB em locais onde há uma alta prevalência de resistência a

drogas, considerando que resistência a RIF na ausência de resistência a INH é incomum (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; BOEHME *et al.*, 2010).

Porém, a natureza fundamental do PCR e dos *molecular beacons* é que uma amostra deve ser analisada em busca da presença ou ausência de uma sequência específica de DNA, e esta deve ser previamente conhecida. Neste sentido, deve-se conhecer uma mutação específica responsável por resistência a droga, para saber se aquela sequência específica está ou não presente na amostra. E o Xpert MTB/RIF se baseia no fato de que apenas três mutações bem caracterizadas conferem 95% de todos os casos clínicos atuais de resistência a RIF. Por outro lado, resistência a INH pode ser causada por centenas de mutações diferentes, muitas das quais continuam desconhecidas, e outros antibióticos estão entre esses extremos em termos do número de mutações que já foram identificados em isolados clínicos resistentes. Portanto, considerando-se a evolução contínua das bactérias, a eficácia continuada de qualquer ensaio dependente de sequências específicas de DNA não é garantida (SANDGREN *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2011).

Outra preocupação técnica na interpretação clínica do Xpert MTB/RIF é a sua leitura de infecções mistas. Dependendo do alelo *rpoB* sendo testado, o ensaio requer que 65%, ou até mesmo 100% do DNA contenha o alelo *rpoB* mutante para que o diagnóstico de resistência a RIF seja feito com confiança de 95% (JAIN *et al.*, 2011).

Por último, a utilidade do Xpert MTB/RIF também é limitada pelo seu custo, que ainda é muito alto para ser acessível em locais de baixa renda (JAIN *et al.*, 2011).

2.7.2. Métodos fenotípicos

Os testes fenotípicos do metabolismo e crescimento bacteriano não dependem de um conhecimento prévio dos mecanismos de resistência que possam estar envolvidos. Eles procuram por fenótipos de resistência ao avaliar a inibição do crescimento de determinado microrganismo na presença de antibióticos. São em geral mais simples de se realizar, não necessitando profissionais especializados, e tendem a ter um menor custo quando comparados aos métodos moleculares, o que

facilita a implantação em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011; JAIN *et al.*, 2012).

A cultura microbiana, um teste fenotípico clássico, tem até agora sido o padrão-ouro tanto para diagnóstico de TB, quanto para TSA. Ela é sensível, e os resultados são definitivos em relação a identificação e caracterização (JAIN *et al.*, 2011; JAIN *et al.*, 2012).

Apesar de novos métodos para TSA de cultura em meio líquido e certos métodos genotípicos já terem sido aprovados pela OMS e estarem sendo implantados em programas nacionais de controle da TB ao redor do mundo, os métodos fenotípicos convencionais de cultura em meio sólido ainda são os mais utilizados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Existem três métodos aprovados pela OMS de cultura em meio sólido a base de ovo e/ou de ágar que não são caros e são altamente padronizados para testes de sensibilidade a diversos antimicrobianos: o método da concentração absoluta, o método da razão de resistência e o método das proporções. Senso que desses três, o método das proporções é o mais utilizado (CANETTI *et al.*, 1963; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Porém, os TSA por culturas convencionais em meio sólido requerem o aguardo do tempo de crescimento do microrganismo, que no caso do Mtb pode levar de 4 a 8 semanas. Portanto, outros ensaios fenotípicos têm sido desenvolvidos para reduzir o tempo e o volume de amostra necessários para cultura (JAIN *et al.*, 2011; JAIN *et al.*, 2012).

2.7.2.1. Método da Concentração Absoluta

O método da concentração absoluta baseia-se no princípio de que a composição de uma cultura de Mtb não é uniforme em relação a proporção de bacilos resistentes e sensíveis, mas corresponde estatisticamente a uma curva de distribuição normal. E isso faz com que a resistência por parte do microrganismo seja clinicamente significativa quando pelo menos 1% do total da população bacteriana se desenvolve na denominada concentração crítica, que é a concentração mais baixa do antibiótico capaz de inibir o crescimento dos bacilos

sensíveis. Qualquer proporção de resistência menor do que 1% não possui significância clínica (CANETTI *et al.*, 1963).

Portanto, o método requer particular cuidado no preparo da suspensão bacteriana para inóculo, de forma que esta tenha entre 2×10^5 e 1×10^6 UFC/mL. Então inocula-se 10 µL desta suspensão (2.000 – 10.000 UFC) em meio de cultura Löwenstein-Jensen (L-J) contendo a concentração crítica de um antibiótico (tubo teste) e em meio L-J sem antibiótico (tubo controle). E depois de incubados a 37°C por 4 semanas, se o tubo controle apresentar crescimento confluyente, será considerado resistência se houver 20 (1% do inóculo) ou mais colônias no tubo teste (CANETTI *et al.*, 1963).

2.7.2.2. Método da Razão de Resistência

Este método se baseia na relação entre a concentração inibitória mínima (CIM) da cepa teste e a CIM da cepa H₃₇Rv, que é uma cepa referência sabidamente sensível a todos os antibióticos anti-TB. Se a razão entre a CIM da cepa teste e a CIM da H₃₇Rv for menor ou igual a 2, o teste é considerado sensível. Caso a razão seja igual a 4, o resultado é duvidoso. E se a razão for igual ou maior a 8, a cepa teste é considerada resistente ao antibiótico (CANETTI *et al.*, 1963).

2.7.2.3. Método das Proporções

O método das proporções se baseia no mesmo princípio do método da concentração absoluta. Entretanto, o método das proporções permite o cálculo da proporção de bacilos resistentes e de bacilos sensíveis em uma população, através da sementeira de diluições do inóculo em tubos contendo L-J sem e com droga na concentração crítica. Se as diluições forem bem escolhidas, pode-se obter colônias contáveis, calculando-se a partir daí a proporção de bactérias resistentes na população total viável (CANETTI *et al.*, 1963).

O método das proporções tem a grande vantagem de que a padronização do tamanho do inóculo não é de importância crítica por causa da contagem de colônias que é realizada no teste, o que lhe garante a possibilidade de também ser um teste direto, desde que se tenha em mãos o resultado da baciloscopia da amostra que

influenciará nas diluições realizadas. Porém, o método das proporções é mais demorado e laborioso para ser realizado do que os dois anteriores (CANETTI *et al.*, 1963).

2.7.2.4. MGIT

O MGIT (do inglês *Mycobacteria Growth Indicator Tube*) (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) é um sistema automatizado de cultura líquida baseado na detecção de fluorescência do crescimento micobacteriano num tubo contendo meio Middlebrook 7H9 modificado com um sensor fluorescente baseado na extinção do oxigênio embebido em silicone no fundo do tubo. O consumo do oxigênio do meio desinibe o sensor, que produz fluorescência quando iluminado por uma lâmpada ultravioleta (PALOMINO, 2006).

Os resultados são obtidos em 3 a 14 dias após o isolamento primário (método indireto) e apresenta excelente correlação com o método das proporções (LOIEZ-DUROCHER, VACHEE e LEMAITRE, 2000; HUANG *et al.*, 2004). Também já foi amplamente validado para as drogas anti-TB de primeira linha, sendo atualmente considerado o padrão-ouro dos testes fenotípicos (LOIEZ-DUROCHER, VACHEE e LEMAITRE, 2000; HUANG *et al.*, 2004; KRUUNER, YATES e DROBNIEWSKI, 2006; PALOMINO, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

As únicas limitações para uma ampla implantação dessa técnica seriam o seu custo, que pode ser alto em muitos locais especialmente em países altamente endêmicos, e a necessidade de uma boa estrutura laboratorial com disponibilização de equipamentos para conter o risco biológico elevado do procedimento, o que permite sua utilização apenas em centros de referência (PALOMINO, 2006; BANADA *et al.*, 2010).

2.7.2.5. Ensaios Baseados em Micobacteriófagos

Existem duas abordagens diferentes ao utilizar micobacteriófagos em ensaios para detecção de resistência em TB. O método pode se basear na amplificação do vírus ou na expressão de genes relatores (PALOMINO, 2006).

No kit comercial FASTPlaque TB, os bacilos de Mtb são infectados por micobacteriófagos D29 e depois inoculados em meio de cultura sólido contendo antibiótico. Em seguida, inocula-se em toda a superfície do meio uma suspensão de *M. smegmatis*, que é uma micobactéria de crescimento rápido. Caso a cepa de Mtb seja sensível ao antibiótico em teste, o micobacteriófago não será replicado e o *M. smegmatis* crescerá confluentemente por todo o meio de cultura, formando um tapete íntegro. Entretanto, se a cepa for resistente, os bacilos de Mtb estarão metabolicamente ativos, portanto o vírus será replicado, provocará a lise das células de Mtb, e infectarão o *M. smegmatis* que também será lisado, fazendo com que o crescimento no meio de cultura seja irregular, formando buracos (ou placas) no tapete (JAIN *et al.*, 2011; RONDON *et al.*, 2011).

O outro método utiliza um micobacteriófago geneticamente modificado que carrega um gene relator fluorescente. As cepas de Mtb são cultivadas em meio líquido na presença de antibiótico e então infectadas pelo micobacteriófago. Se as cepas forem resistentes ao antibiótico, elas vão transcrever e traduzir o gene numa proteína fluorescente (luciferase). Portanto a presença de fluorescência indica resistência (JAIN *et al.*, 2011; RONDON *et al.*, 2011).

Essas técnicas tem a grande vantagem de serem fenotípicas e rápidas, pois reduzem o tempo da cultura para apenas dois ou três dias (JAIN *et al.*, 2011; RONDON *et al.*, 2011).

2.7.2.6. Métodos Colorimétricos

Os métodos colorimétricos se baseiam na redução de um indicador colorido adicionado ao meio de cultura após o Mtb ter sido exposto *in vitro* a diferentes antibióticos. Caso os bacilos estejam metabolicamente ativos no meio de cultura, ou seja, sejam resistentes ao antibiótico, o indicador será metabolizado e sua cor será alterada. Entre os diferentes indicadores avaliados, os mais utilizados são o tetrazólio (MTT[®]) e a resazurina (Alamar Blue[®]) (PALOMINO, 2006).

2.7.2.7. Ensaio da Nitrato Redutase

O ensaio da nitrato redutase é uma técnica muito simples baseada na capacidade do Mtb reduzir nitrato incorporado ao meio de cultura a nitrito, que é detectado pela adição do reagente de Griess. O Mtb é cultivado na presença de um antibiótico e sua habilidade de reduzir nitrato é medida após 10 dias de incubação. Cepas resistentes vão reduzir o nitrato a nitrito, que é revelado por uma coloração roxa no meio (ANGEBY, KLINTZ e HOFFNER, 2002; PALOMINO, 2006).

2.7.2.8. MODS

O ensaio MODS (do inglês *microscopic-observation drug-susceptibility*) é um teste baseado em cultura líquida que detecta Mtb e avalia resistência a INH e a RIF diretamente de amostras de escarro. O método faz uso de duas propriedades importantes do Mtb: (1) crescimento marcadamente mais rápido em meio líquido do que em meio sólido, e (2) a facilmente reconhecível e característica formação de corda do crescimento em meio líquido. Usando um microscópio de luz invertida, placas de 24 poços inoculadas com amostras de escarro descontaminadas suspensas em meio Middlebrook 7H9 suplementado são examinadas em busca de microcolônias, as quais podem ser detectadas numa média de 7 dias, muito mais cedo do que o crescimento macroscópico de colônias em meio sólido. A incorporação de INH e RIF no teste possibilita a rápida detecção de MDR-TB (CORONEL, 2008; JAIN *et al.*, 2011; CHAIYASIRINROJE *et al.*, 2012).

2.8. JUSTIFICATIVA

Ao redor do mundo, a falta de recursos dos laboratórios tem se mostrado o elo mais fraco para o desenvolvimento de um sistema confiável de vigilância e controle das formas de TB resistente. Em 2011, dos 8.7 milhões de novos casos relatados no mundo, menos de 5% foram submetidos a um TSA. No Brasil, menos de 1% dos novos casos e apenas 6% dos casos de retratamento foram submetidos a um TSA. Em decorrência desses fatos, a OMS estima que apenas 10% dos casos

de MDR-TB são diagnosticados ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; PONTALI, MATTEELLI e MIGLIORI, 2013).

Atualmente, os métodos genotípicos possuem custo muito alto para implantação e execução, além de precisarem de profissionais especializados para a sua realização (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011). Já os métodos fenotípicos mais utilizados, por serem indiretos, possuem a grande desvantagem do longo tempo para liberação dos resultados (até 8 semanas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), e mesmo os novos testes fenotípicos que detectam mais rapidamente o crescimento micobacteriano, ou são caros ou são de difícil execução (PALOMINO, 2006; JAIN *et al.*, 2011).

Considerando que a maioria dos métodos de TSA não é acessível para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, os quais são altamente endêmicos para TB, há uma necessidade urgente de novos ensaios que apresentem boa acurácia e eficácia continuada, e que se possível sejam relativamente rápidos, de fácil execução e de baixo custo, e o mais importante, que possam ser aplicados nas unidades de saúde de qualquer país no mundo (PALOMINO, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; STOP TB PARTNERSHIP, 2010; JAIN *et al.*, 2011; JAIN *et al.*, 2012).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar um método fenotípico direto para determinação da sensibilidade do Mtb aos fármacos da primeira linha de tratamento da TB, com base nos princípios do método das proporções e do exame de cultura pelo método de Ogawa - Kudoh (O-K).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar diferentes tipos de swabs e determinar qual o mais adequado para o método proposto;
- 2) Avaliar diferentes meios de cultura a base de ovo e determinar o mais adequado para o método proposto;
- 3) Avaliar se a composição química do meio de cultura escolhido (item 2) interfere na atividade dos antimicrobianos INH, RIF, EMB e SM;
- 4) Avaliar se há necessidade de se diluir a amostra de escarro para realização do teste de sensibilidade do Mtb a antimicrobianos proposto neste estudo;
- 5) Determinar qual deve ser o tempo de incubação para se fazer a leitura do novo teste de sensibilidade do Mtb a antimicrobianos proposto neste estudo;
- 6) Avaliar a taxa de contaminação do novo teste de sensibilidade do Mtb a antimicrobianos proposto neste estudo;
- 7) Avaliar a concordância do novo teste de sensibilidade do Mtb a antimicrobianos proposto neste estudo com o método do MGIT (padrão-ouro), utilizando amostras de escarro provenientes de pacientes com TB pulmonar;

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ESTRATÉGIA DO ESTUDO

4.1.1. Delineamento

Trata-se de um Estudo Experimental de Teste Diagnóstico para o desenvolvimento de um método para determinação da sensibilidade do Mtb a drogas anti-TB da primeira linha de tratamento.

4.1.2. Local

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.1.3. Desenho

O presente estudo foi dividido em duas fases. A primeira fase consistiu no desenvolvimento e padronização do TSA proposto, quando se analisou: os volumes de absorção e de liberação de diferentes tipos de swab; qual meio de cultura e quais concentrações dos antimicrobianos seriam mais adequadas; e finalmente qual taxa de diluição das amostras e qual o tempo de leitura das culturas seriam utilizados. A segunda fase consistiu na análise da concordância entre o método desenvolvido e o método do MGIT (padrão-ouro). Todos os testes foram realizados em triplicata, excetuando-se aqueles que são descritos com o número de ensaios nas tabelas.

4.2. AMOSTRAS CLÍNICAS

Neste estudo, utilizamos somente amostras de escarro espontâneo selecionadas entre as amostras enviadas ao laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES para diagnóstico de TB, baseados nos seguintes critérios:

4.2.1. Critérios de Inclusão

- Amostra de paciente previamente cadastrado no ambulatório de Tisiologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da UFES, com diagnóstico confirmado de TB pulmonar;
- Que já houvesse sido liberada para descarte pela rotina do laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES;
- Resultado positivo na baciloscopia (1+, 2+ ou 3+) ou suspeita de MDR-TB por indicação na prescrição médica;
- Volume mínimo de 4 mL.

4.2.2. Critérios de Exclusão

- Amostras processadas pela técnica do NALC/NaOH.

4.2.3. Fluxograma de seleção

Todas as amostras de escarro espontâneo que chegam ao laboratório de micobacteriologia do NDI/UFES entram no mesmo dia na rotina de diagnóstico de TB que consiste na realização de um esfregaço direto em lâmina para baciloscopia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) e de um exame de cultura em meio O-K através do método de descontaminação de O-K (KUDOH e KUDOH, 1974; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Ambos os procedimentos apenas retiram um pequeno volume da amostra.

Após estes procedimentos, o restante da amostra é armazenado sob refrigeração (2 – 8°C) e a lâmina com o esfregaço é corada pela técnica de Auramina-O para baciloscopia em microscópio de fluorescência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Ao ser emitido o resultado da baciloscopia (em no máximo 72 horas) e a rotina se certificar de que não há necessidade de repetir nenhum dos procedimentos, a amostra é então liberada para ser descartada. Neste momento

ocorreu a seleção das amostras para o estudo, que foram descartadas após o uso (Figura 3).

Entretanto, em casos graves de TB, alguns médicos solicitam ao laboratório para que o escarro seja inoculado no MGIT. Dessa forma, a amostra é processada pela técnica de NALC/NaOH (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Nestes casos, como a sobra não é representativa da amostra original, essas amostras não foram incluídas no estudo.

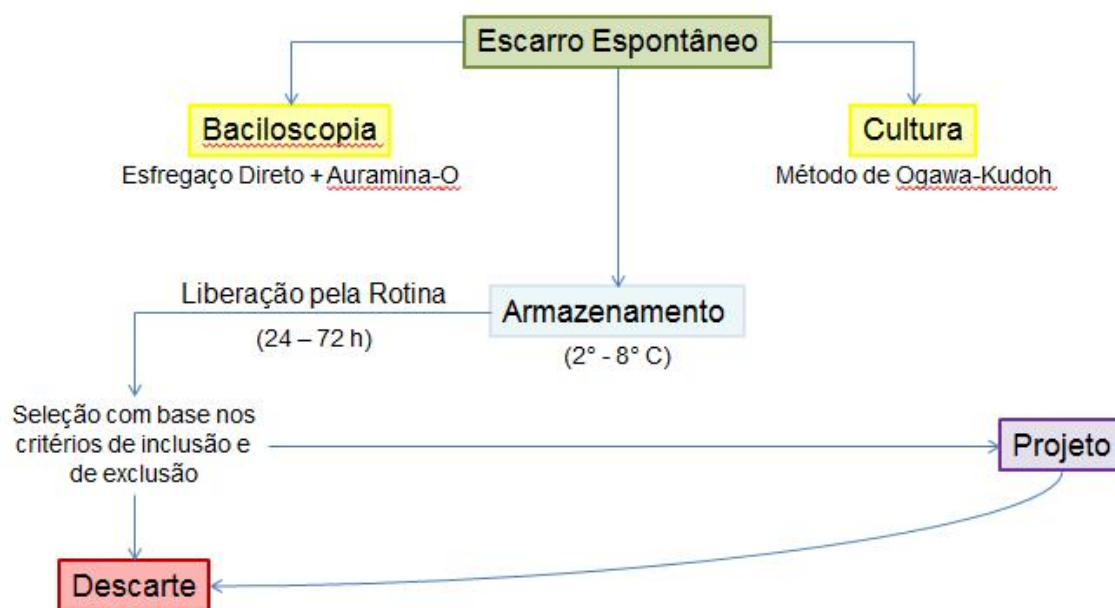


Figura 3. Fluxograma de seleção das amostras clínicas.

4.3. CEPAS DE REFERÊNCIA

Em algumas etapas do estudo, utilizamos cepas de referência adquiridas pelo ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*), que foram as:

- *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC® 27294™)
- *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv-INH-R (ATCC® 35822™)
- *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv-RIF-R (ATCC® 35838™)
- *Mycobacterium avium* (ATCC® 25291™)

4.4. PADRONIZAÇÃO DO SWAB

Para determinação de qual swab utilizar na técnica, compararam-se dois tipos diferentes de swab. Um de fabricação caseira, produzido com espeto de bambu e algodão hidrófilo no NDI/UFES, e uma marca comercial (Absorve®).

Inicialmente, mediu-se com régua milimetrada o comprimento dos dois swabs e mediu-se com água destilada o volume necessário para cobrir toda a extremidade com algodão dos swabs, dentro dos tubos graduados de polipropileno, com capacidade de 50 mL, que foram utilizados no método proposto.

Posteriormente, compararam-se também os volumes de absorção e os volumes liberados de ambos os tipos de swab.

4.4.1. Volume absorvido

A capacidade de absorção dos swabs foi analisada com água destilada estéril. Utilizou-se determinados períodos de tempo e de volume, a fim de analisar o quanto essas variáveis influenciam na absorção.

Para tanto, pipetou-se um volume inicial determinado de água destilada estéril (Tabela 2) em tubos de hemólise com pipeta graduada de 2 mL. Em seguida, colocou-se um swab em cada tubo de hemólise e cronometrou-se o tempo. Após o período de tempo determinado (Tabela 2), o swab foi retirado do tubo de hemólise e o volume restante no tubo foi determinado aspirando-se a água com a pipeta graduada de 3 mL. Finalmente, calculou-se o volume absorvido subtraindo-se o volume inicial pelo volume restante.

Esse procedimento foi dividido em duas etapas. Na primeira, as duas marcas de swab foram submetidas ao teste para posterior comparação entre marcas. Na segunda etapa, apenas a marca escolhida para o novo método desenvolvido foi submetida ao teste para definição do tempo mínimo de absorção máxima.

4.4.2. Volume liberado

O volume liberado pelos swabs no meio de cultura foi determinado com base na realização de dois testes. O primeiro para detectar até qual diluição os swabs

conseguiram liberar o Mtb no meio de cultura e o segundo para determinar o volume liberado pelos swabs.

Tabela 2. Volumes iniciais e tempos determinados para cada etapa do teste de absorção dos swabs

Etapa	Volume inicial	Tempo
1ª etapa	3 mL	120 s
	3 mL	60 s
	2 mL	120 s
	2 mL	60 s
	1 mL	120 s
	1 mL	60 s
2ª etapa	2 mL	120 s
	2 mL	90 s
	2 mL	60 s
	2 mL	30 s
	2 mL	10 s

mL: mililitros; s: segundos

Os dois testes foram realizados com a cepa de referência Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™), que foi subcultivada em meio O-K e incubada por 14 dias em estufa a 37°C para preparo do inóculos utilizados.

No primeiro teste, uma alça bacteriológica do subcultivo foi suspensa em 200 µL de água destilada estéril, em tubos com pérolas de vidro. A suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico (Scientific Industries/Vortex Genie 2) durante 30 segundos. Acrescentou-se 3 mL de água destilada, agitou-se novamente por mais 10 segundos e então as suspensões foram deixadas em repouso por 20 minutos para decantação dos grumos. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante da suspensão foi transferido para um tubo sem pérolas de vidro com 5 mL de água destilada estéril para fazer uma suspensão com turbidez equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland. De acordo com padronizações realizadas no laboratório (dados não mostrados), o padrão 1,0 da escala de McFarland possui uma densidade ótica (D.O.) de 0,25 (±0,01) a 625nm (Espectrofotômetro Microprocessado Visível Digital Bivolt modelo Q 798DRM) e as suspensões bacterianas com D.O. equivalente possuem uma concentração na ordem de 10⁷ UFC/mL. Após a obtenção das suspensões com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10⁷ UFC/mL), foram realizadas diluições seriadas de 10, 100, 1000, 10000 e 100000

vezes em tubos de hemólise, transferindo-se 0,3 mL da diluição anterior para 2,7 mL de uma solução composta por NaCl (Vetec) 0,9% m/v e Tween® 80 (Merck) 0,25% v/v.

Em seguida, colocou-se um swab comercial em cada uma das três últimas diluições (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) durante um minuto, e depois foram removidos retirando-se o excesso na parede do tubo de hemólise e usados para fazer o inóculo em meio O-K. O mesmo foi feito logo depois com o swab caseiro. Todos os meios O-K inoculados foram incubados por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias e escolheu-se a diluição com 10 a 100 colônias visíveis para ser utilizada no segundo teste.

No segundo teste, preparou-se uma suspensão de Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™) com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10^7 UFC/mL) como descrito acima, que foi submetida a diluições seriadas em água destilada estéril até 10000 vezes (10^{-4}) em tubos de hemólise, transferindo-se 0,3 mL da diluição anterior para 2,7 mL de uma solução composta por NaCl (Vetec) 0,9% m/v e Tween® 80 (Merck) 0,25% v/v.

Posteriormente, inoculou-se 100 µL com pipeta automática da diluição 10^{-4} em meio O-K para se utilizar um volume conhecido para posterior comparação com os volumes liberados dos swabs. Em seguida, colocou-se o swab comercial na mesma diluição (10^{-4}) durante um minuto, que depois foi removido retirando-se o excesso na parede do tubo de hemólise e usado para fazer o inóculo em meio O-K. O mesmo foi logo feito com o swab do NDI/UFES. Todos os meios O-K inoculados foram incubados por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa. O número de colônias foi, então, corrigido de acordo com o volume de 100 µL inoculado pela pipeta automática e expresso em volume liberado (mL) por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Volume liberado pelo swab} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colônias no tubo do swab} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ colônias no tubo da pipeta automática}}$$

4.5. PADRONIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

4.5.1. Seleção do meio de cultura

Para definir qual meio de cultura seria utilizado no método, comparou-se os 4 meios de cultura a base ovo mais utilizados ao redor do mundo: o L-J, o Ogawa 1%, o O-K e o Ogawa 3% (Tabela 3) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998), a fim de definir qual produziria o melhor crescimento micobacteriano após inoculação via técnica de O-K.

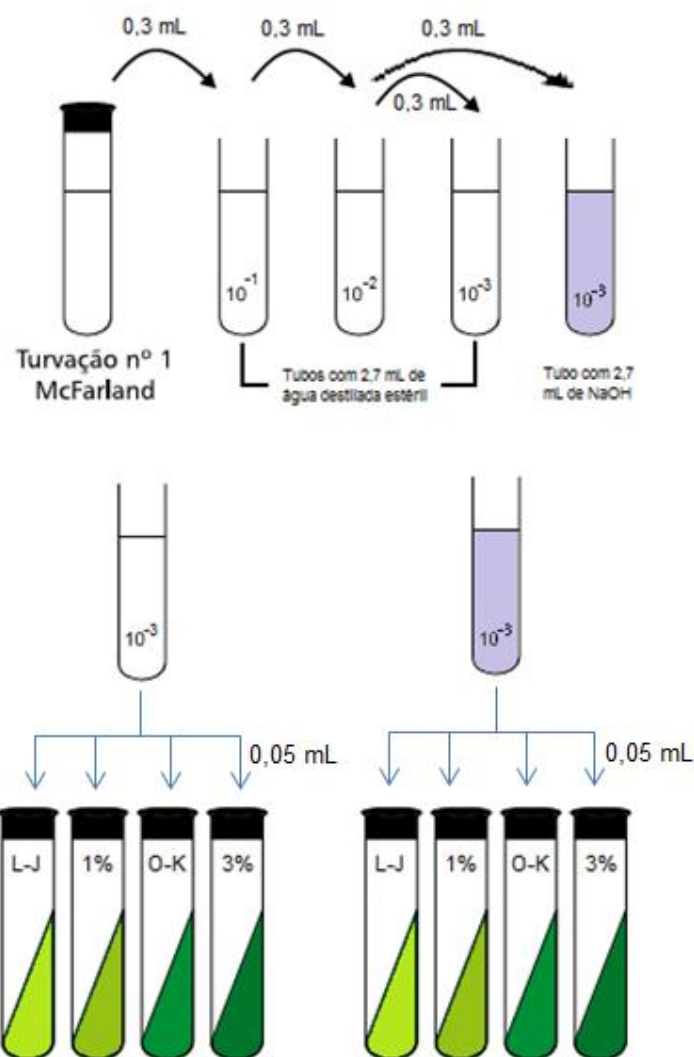
Tabela 3. Composição química dos meios de Löwenstein-Jensen, Ogawa 1%, Ogawa-Kudoh e Ogawa 3%

Componentes	L-J	Ogawa 1%	O-K	Ogawa 3%
Fosfato monopotássico	0,4 g	1,0 g	2,0 g	3,0 g
Sulfato de magnésio	0,04 g	-	-	-
Citrato de magnésio	0,1 g	-	0,1 g ^a	-
Glutamato de sódio	-	1,0 g	0,5 g	1,0 g
Asparagina	0,6 g	-	-	-
Glicerol	2,0 mL	6,0 mL	4,0 mL	6,0 mL
Verde malaquita 2%	3,3 mL	6,0 mL	4,0 mL	6,0 mL
Água destilada	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL
Homogeneizado de ovos	167,0 mL	200,0 mL	200,0 mL	200,0 mL
pH final obtido:	7,20	6,81	6,46	6,31

^a este componente não é essencial para a detecção do bacilo da TB, mas melhora a viabilidade deste microrganismo

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998

Para tanto, baseado no experimento realizado por Kudoh e Kudoh (KUDOH e KUDOH, 1974), preparou-se uma suspensão de Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™) com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10⁷ UFC/mL) como descrito acima, que foi submetida a diluições seriadas em água destilada estéril de 10, 100 e 1000 vezes. Inoculou-se então 50 µL da diluição 10⁻³ nos 4 meios de cultura a base de ovo. Posteriormente, transferiu-se 300 µL da diluição 10⁻² para um tubo de hemólise com 2,7 mL de NaOH. E, em menos de 2 minutos, inoculou-se 50 µL dessa diluição nos 4 meios de cultura (Figura 4). Todos os meios de cultura inoculados foram incubados por 42 dias em estufa a 37°C para contagem semanal de colônias.



Fonte: Adaptado de KUDOH e KUDOH, 1974.

Figura 4. Esquema do teste para seleção do meio de cultura

4.5.2. Análise da atividade dos antimicrobianos no meio O-K

4.5.2.1. Seleção dos Antimicrobianos

Os antimicrobianos selecionados foram os fármacos anti-TB da primeira linha de tratamento recomendados para TSA em meio sólido pela OMS (INH, RIF, EMB e SM). A OMS recomenda que se teste a PZA apenas em meios líquidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), portanto ela não foi incluída na metodologia. Além disso, por estarmos desenvolvendo um método direto, acrescentamos o ácido para-

nitrobenzóico (PNB) e a hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) para incluir um teste de identificação simultâneo ao teste de sensibilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Foram preparadas soluções-estoque (Tabelas 4 e 5) de acordo com as recomendações do CLSI (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2005; CLSI, 2011) e do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), baseando-se nas concentrações críticas aprovadas pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009) e pela Sociedade Japonesa de Tuberculose (TANOUE, MITARAI e SHISHIDO, 2002; TAKAKURA *et al.*, 2005) para os meios sólidos a base de ovos. Após o preparo, essas soluções foram imediatamente filtradas em membrana de poro 0,22 µm, aliquotadas em criotubos e armazenadas a -70°C, sob condições estéreis.

Tabela 4. Nome e fabricante dos fármacos anti-TB selecionados.

Nome	Fabricante
Isoniazida ≥ 99% (TLC)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Rifampicina ≥ 97% (HPLC), pó	Sigma-Aldrich Co., EUA
Dicloridrato de etambutol, antimicobacteriano	Sigma-Aldrich Co., EUA
Sesquissulfato de diidrostreptomicina ≥ 98% (TLC)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico ≥ 98%	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido nitrobenzóico-4(para) puro	Vetec Química Fina LTDA., Brasil

TLC: Thin layer chromatography; HPLC: High-performance liquid chromatography

Tabela 5. Solvente, diluente, concentração estoque, volume adicionado ao meio e concentração final dos antimicrobianos selecionados.

Droga	Solvente	Diluente	Concentração estoque	Volume adicionado a 100 mL de meio	Concentração final
INH	H ₂ O	H ₂ O	0,2 mg/mL	0,1 mL	0,2 µg/mL ^{a,b}
RIF	DMSO	H ₂ O	10,0 mg/mL	0,4 mL	40,0 µg/mL ^{a,b}
EMB	H ₂ O	H ₂ O	2,0 mg/mL	0,1 mL	2,0 µg/mL ^a
			2,5 mg/mL	0,1 mL	2,5 µg/mL ^b
SM	H ₂ O	H ₂ O	4,0 mg/mL	0,1 mL	4,0 µg/mL ^a
			10,0 mg/mL	0,1 mL	10,0 µg/mL ^b
PNB	NaOH	H ₂ O	25,0 mg/mL	2,0 mL	500,0 µg/mL ^c
TCH	H ₂ O	H ₂ O	1,0 mg/mL	0,5 mL	5,0 µg/mL ^c

H₂O: água deionizada estéril; DMSO: dimetilsulfóxido; NaOH: hidróxido de sódio 4% m/v

^a concentração validada para L-J

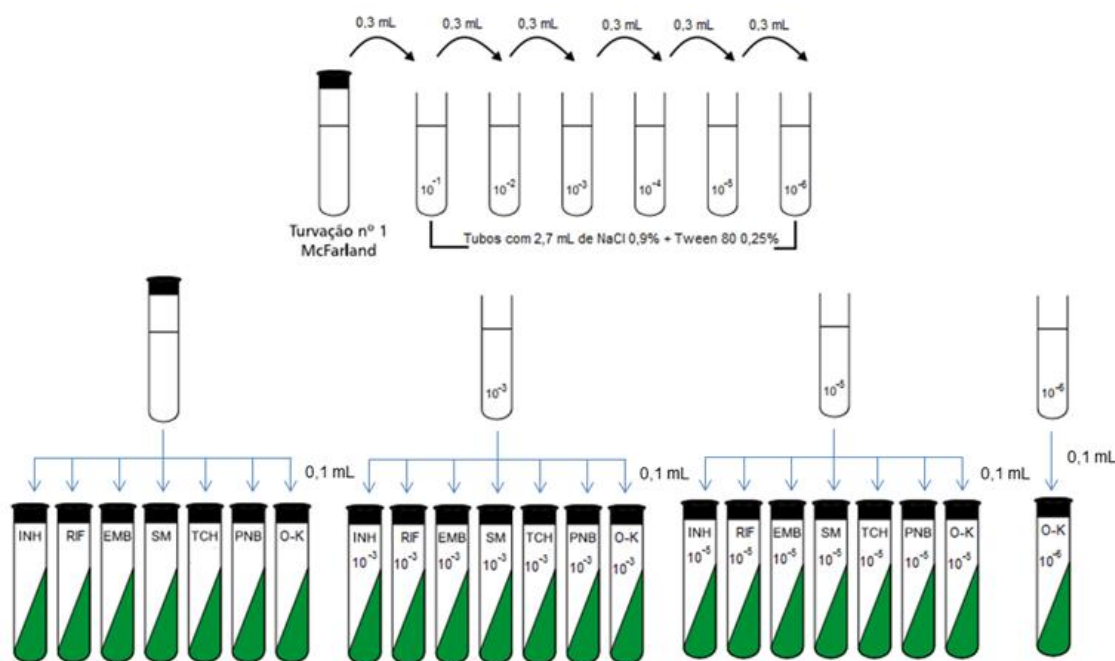
^b concentração validada para Ogawa 1%

^c concentração validada para L-J e O-K

Fontes: Adaptado de TANOUE, MITARAI e SHISHIDO, 2002; CLSI, 2005; TAKAKURA *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; CLSI, 2011.

4.5.2.2. Teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K

Avaliou-se o crescimento de diferentes cepas de referência no meio de cultura O-K com e sem antimicrobiano baseado no controle de qualidade para meios de cultura para TSA de Mtb descrito pelo Ministério da Saúde (Figura 5) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).



Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008.

Figura 5. Esquema do teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K.

Utilizou-se as cepas Mtb H₃₇Rv (ATCC[®] 27294[™]) como controle sensível a todos os antimicrobianos, exceto ao TCH; Mtb H₃₇Rv-INH-R (ATCC[®] 35822[™]), e Mtb H₃₇Rv-RIF-R (ATCC[®] 35838[™]) como controles resistentes a INH e RIF, respectivamente; e *M. avium* (ATCC[®] 25291[™]) como controle resistente ao PNB, que foram subcultivadas em meio O-K e incubadas por 14 dias em estufa a 37°C para preparo do inóculo utilizado no teste.

Preparou-se uma suspensão de cada cepa com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10^7 UFC/mL) como descrito acima, foram realizadas diluições seriadas de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes em tubos de

hemólise, transferindo-se 0,3 mL da diluição anterior para 2,7 mL de uma solução composta por NaCl (Vetec) 0,9% m/v e Tween® 80 (Merck) 0,25% v/v.

Posteriormente, inoculou-se 100 µL com pipeta automática da suspensão com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland e das diluições 10^{-3} e 10^{-5} em cada um dos meios O-K com e sem antimicrobiano. Além disso, acrescentou 100 µL da diluição 10^{-6} apenas em meio O-K sem antimicrobiano. Todos os meios de cultura inoculados foram incubados por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias e posteriormente obter a média do número de colônias em cada diluição.

As diferentes concentrações de EMB e SM também foram testadas com amostras clínicas durante a padronização da técnica, devido a não disponibilidade de cepas de referência resistentes a esses antimicrobianos.

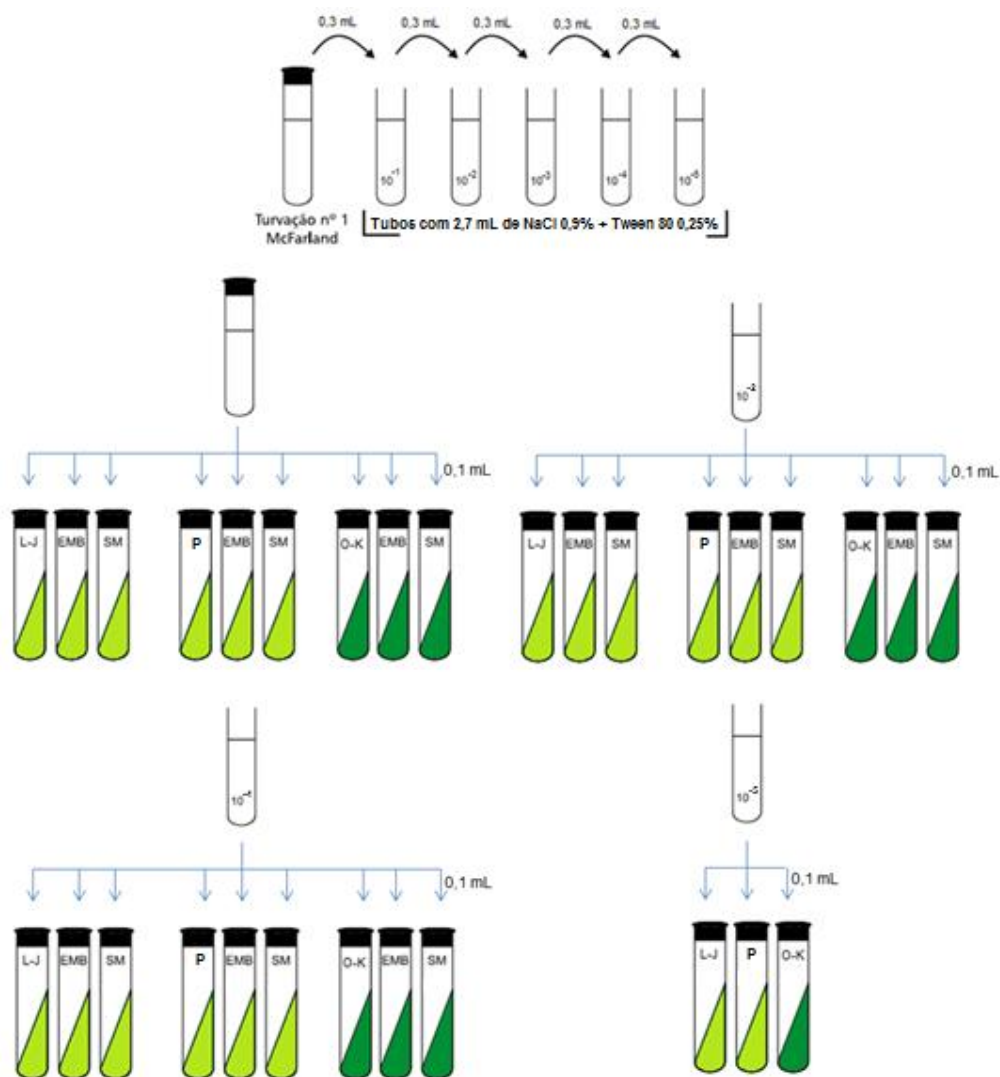
4.5.2.3. Teste da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura

Como apresentaram ação diferenciada dependendo do meio de cultura em que estavam, avaliou-se a ação do EMB e da SM em três diferentes meios de cultura baseado no controle de qualidade para meios de cultura para TSA de Mtb descrito pelo Ministério da Saúde, como descrito acima (Figura 6) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Para este teste, utilizaram-se os meios L-J, O-K e uma composição modificada do O-K (P), no qual substituiu-se a quantidade de fosfato monopotássico do meio O-K pela do meio L-J (Tabela 6). As concentrações de EMB e SM nos meios foram respectivamente 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL.

Utilizou-se a cepa Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™) como controle sensível aos dois antimicrobianos testados, que foi subcultivada em meio O-K e incubada por 14 dias em estufa a 37°C para preparo do inóculo utilizado no teste.

Preparou-se uma suspensão da bactéria com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10^7 UFC/mL) e foram realizadas diluições seriadas até 100000 vezes, como descrito no teste das concentrações dos antimicrobianos.



Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008.

Figura 6. Esquema do teste da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e SM nos meios de cultura.

Tabela 6. Composição química dos meios Löwenstein-Jensen, Ogawa-Kudoh modificado e Ogawa-Kudoh

Componentes	L-J	P	O-K
Fosfato monopotássico	0,4 g	0,4 g	2,0 g
Sulfato de magnésio	0,04 g	-	-
Citrato de magnésio	0,1 g	-	-
Glutamato de sódio	-	0,5 g	0,5 g
Asparagina	0,6 g	-	-
Glicerol	2,0 mL	4,0 mL	4,0 mL
Verde malaquita 2%	3,3 mL	4,0 mL	4,0 mL
Água destilada	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL
Homogeneizado de ovos	167,0 mL	200,0 mL	200,0 mL

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998

Posteriormente, inoculou-se 100 µL com pipeta automática da suspensão com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland e das diluições 10^{-2} e 10^{-4} em cada um dos meios de cultura com EMB, SM e sem antimicrobiano. Além disso, acrescentou 100 µL da diluição 10^{-5} apenas em meio O-K sem antimicrobiano. Todos os meios de cultura inoculados foram incubados por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias.

4.6. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DO TSA PROPOSTO

4.6.1. Homogeneização da amostra

Para que se possa comparar o crescimento do Mtb nos diferentes meios de cultura com e sem antimicrobiano, é necessário que a amostra esteja homogênea, para que os inóculos sejam os mais similares possíveis.

Portanto, assim que a amostra de escarro espontâneo era selecionada, ela era submetida a um processo de digestão (Figura 7) (KENT e KUBICA, 1985). Para tanto, as amostras foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno, com capacidade de 50 mL e seu volume medido. Para digestão do escarro foram utilizadas de 10-15 pérolas de vidro e uma solução digestora composta por N-acetil-L-cisteína (Sigma-Aldrich) 0,5% m/v e citrato de sódio (Vetec) 2,9% m/v. O volume utilizado desta solução correspondeu a 10% do volume de escarro. Em seguida a amostra foi submetida a agitação intensa por 20 segundos em agitador mecânico (Scientific Industries / Vortex Genie 2), seguida por repouso durante 15 minutos, com agitação intensa de 15 a 20 segundos a cada 5 minutos.

4.6.2. Determinação das diluições

A fim de determinar quais diluições deveriam ser utilizadas no método desenvolvido, testaram-se todas as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} , além da amostra sem ser diluída (Figura 8), sendo que cada amostra de escarro obtida e suas respectivas diluições foram inoculadas em meios de cultura O-K com e sem antimicrobianos, para posterior comparação do resultado final do teste de acordo com cada diluição.

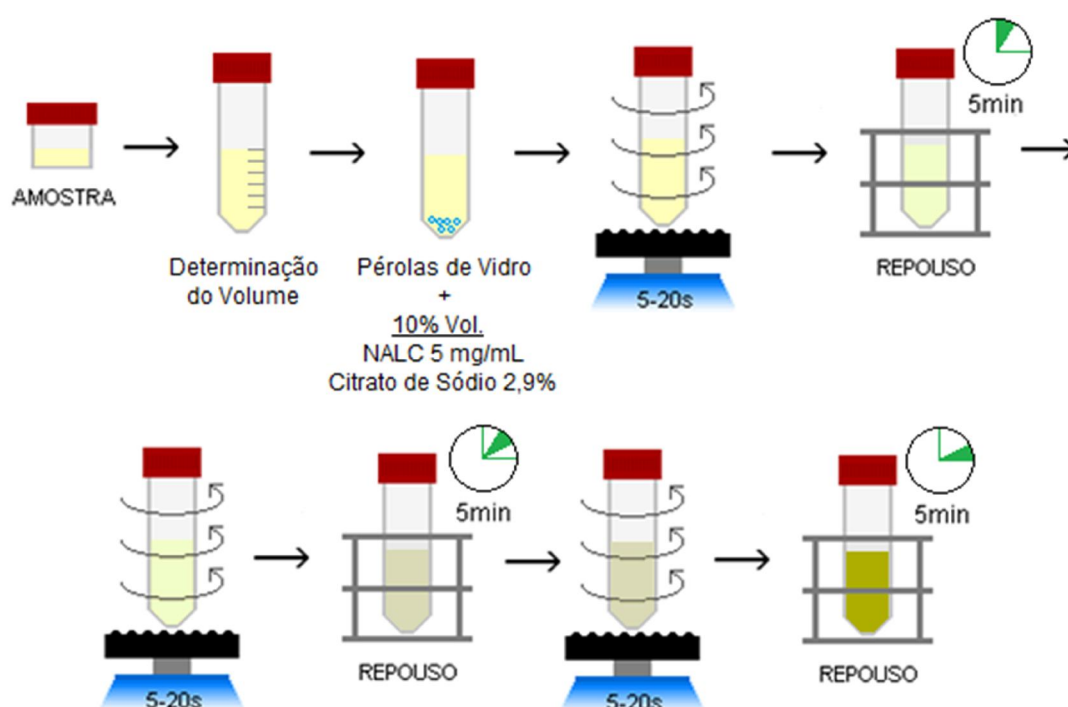


Figura 7. Esquema do processo de homogeneização da amostra

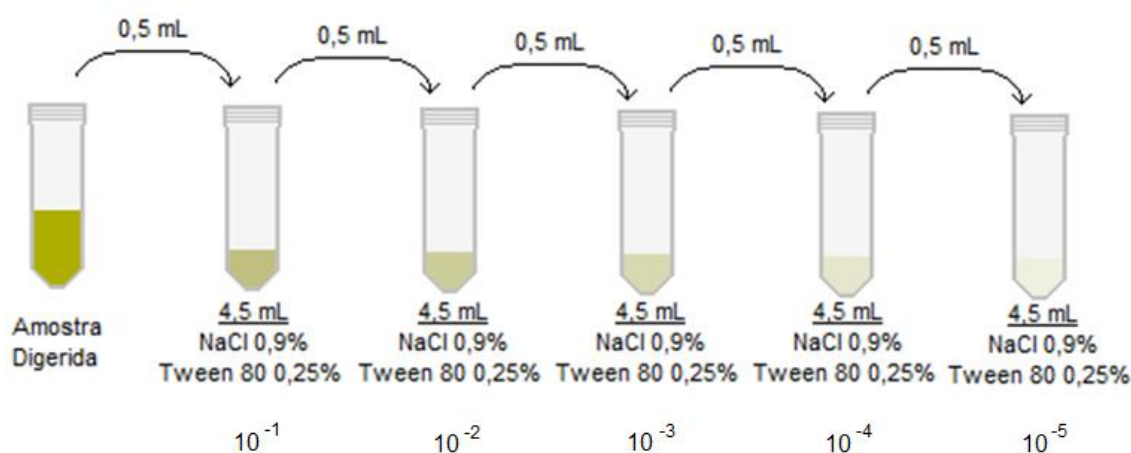
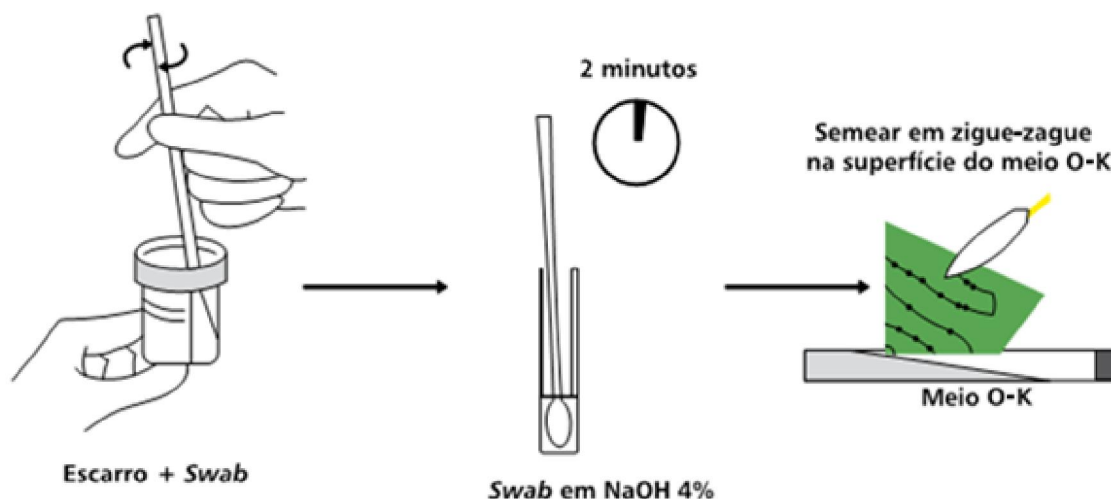


Figura 8. Esquema das diluições da amostra de escarro espontâneo

Para se diluir as amostras, efetuou-se diluições seriadas de 10, 100, 1000, 10000 e 100000 vezes em tubos estéreis de polipropileno, com capacidade de 50 mL, transferindo-se 0,5 mL da diluição anterior para 4,5 mL de uma solução composta por NaCl (Vetec) 0,9% m/v e Tween® 80 (Merck) 0,25% v/v.

4.6.3. Descontaminação e inoculação

A descontaminação e a inoculação da amostra digerida e das diluições nos meios de cultura foram baseadas no método de O-K para exame de cultura (Figura 9) (KUDOH e KUDOH, 1974, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

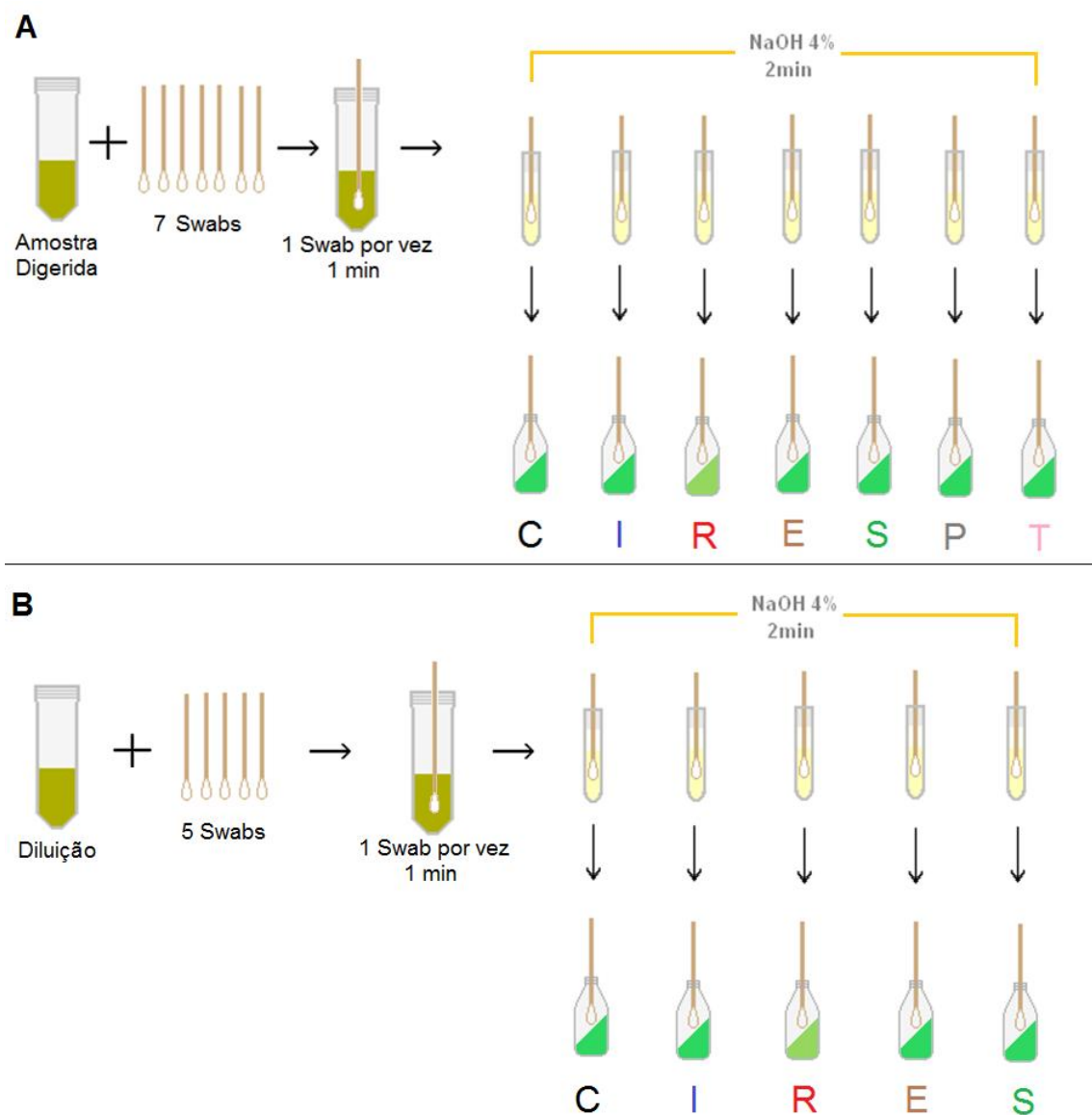


Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008.

Figura 9. Esquema do método de Ogawa-Kudoh para exame de cultura.

Para cada amostra digerida (Figura 10.A), utilizou-se sete swabs e sete meios O-K (controle sem antimicrobiano, INH, RIF, EMB, SM, PNB e TCH). Os tubos com meio O-K contendo PNB e TCH não foram utilizados para as diluições (Figura 10.B), que foram submetidas ao mesmo procedimento que as amostras digeridas.

Primeiramente, embebeu-se um swab de cada vez durante um minuto com a amostra ou com uma diluição. Posteriormente, um swab de cada vez foi descontaminado em um tubo de hemólise contendo três mililitros de solução de NaOH 4% m/v (um tubo para cada swab) por dois minutos. Logo, retirou-se o excesso da solução descontaminante dos swabs, pressionando-os levemente na parede dos tubos de hemólise, e seguiu-se com a semeadura mediante movimentos rotatórios e em zigue-zague na superfície do meio O-K.



Legenda: A) esquema da descontaminação e da inoculação das amostras digeridas; B) esquema da descontaminação e da inoculação das diluições; C: controle; I: INH; R: RIF; E: EMB; S: SM; P: PNB; T: TCH; NaOH: hidróxido de sódio.

Figura 10. Esquema das descontaminações e das inoculações

Os primeiros testes com EMB e SM foram com as concentrações de 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL, respectivamente. Mas após a análise dos resultados iniciais, as concentrações de EMB e SM foram alteradas para 2,5 µg/mL e 10,0 µg/mL, respectivamente.

4.6.4. Determinação do tempo de incubação

Todos os meios de cultura inoculados foram incubados por 42 dias em estufa a 37°C para contagem semanal de colônias, com o propósito de comparar os resultados do teste nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 de incubação, a fim de determinar qual seria o tempo ideal para a leitura do resultado.

4.6.5. Leitura e interpretação

As leituras foram realizadas por contagem macroscópica do número de colônias na superfície do meio O-K. Todas as contagens foram registradas com todas as observações referentes a cada cultura como: data da leitura, número de colônias visualizadas, características morfológicas da colônia em relação à presença de pigmento e aspecto (lisa ou rugosa; cremosa ou seca), e contaminação parcial ou total de cada tubo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Além do número de colônias visualizadas, também se registrou os resultados em escala semiquantitativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008):

- Menos de 20 colônias = 1-20
- De 20 a 100 colônias = 1+
- Mais de 100 colônias separadas = 2+
- Colônias confluentes (tapete) = 3+

Posteriormente, a proporção de bacilos resistentes foi calculada pela fórmula (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008):

$$\% \text{ de bacilos resistentes} = \frac{\text{número de colônias no tubo com antimicrobiano} \times 100}{\text{número de colônias no tubo controle}}$$

Todos os resultados obtidos com o método desenvolvido foram classificados em viáveis e não viáveis. Entre os testes não viáveis ficaram os que contaminaram, os que não apresentaram crescimento de colônias no tubo controle (não positivaram) e os que positivaram com menos de 100 colônias no tubo controle e não positivaram no tubo teste (resultado inválido). O crescimento de MNT foi considerado viável apenas para o PNB, pois é ele que diferencia as MNT das micobactérias do complexo Mtb. Todos os resultados diferentes dos citados acima

foram considerados viáveis e posteriormente classificados em resistentes ou sensíveis de acordo com critérios de interpretação baseados no fato de que todo resultado com porcentagem de bacilos resistentes maior ou igual a 1% é considerado resistente, e os resultados com porcentagens menores que 1% são considerados sensíveis (CANETTI *et al.*, 1963). Portanto, levando em consideração a escala semiquantitativa do Ministério da Saúde, foram definidos os seguintes critérios de interpretação:

- Crescimento 3+ no tubo controle:
 - Três ou mais colônias no tubo teste = resistente
 - De nenhuma a duas colônias = sensível
- Crescimento 2+ no tubo controle:
 - Duas ou mais colônias no tubo teste = resistente
 - Nenhuma ou uma colônia = sensível
- Crescimento 1+ no tubo controle:
 - Uma ou mais colônias no tubo teste = resistente
 - Nenhuma colônia = inválido
- Crescimento com menos de 20 colônias no tubo controle
 - Uma ou mais colônias no tubo teste = resistente
 - Nenhuma colônia = inválido

4.6.6. Identificação e determinação da taxa de contaminação

Toda cultura positiva foi submetida a uma baciloscopia pela coloração de Ziehl-Neelsen (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) para confirmar se eram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) ou outros microrganismos considerados contaminantes e posteriormente repicados em meio contendo PNB e TCH (técnica indireta) para confirmação da identificação. Posteriormente, calculou-se a taxa de contaminação pela fórmula:

$$\text{Taxa de contaminação} = \frac{\text{tubos contaminados} \times 100}{\text{total de tubos}}$$

4.7. COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DO MGIT (PADRÃO-OURO)

4.7.1. Armazenamento dos isolados

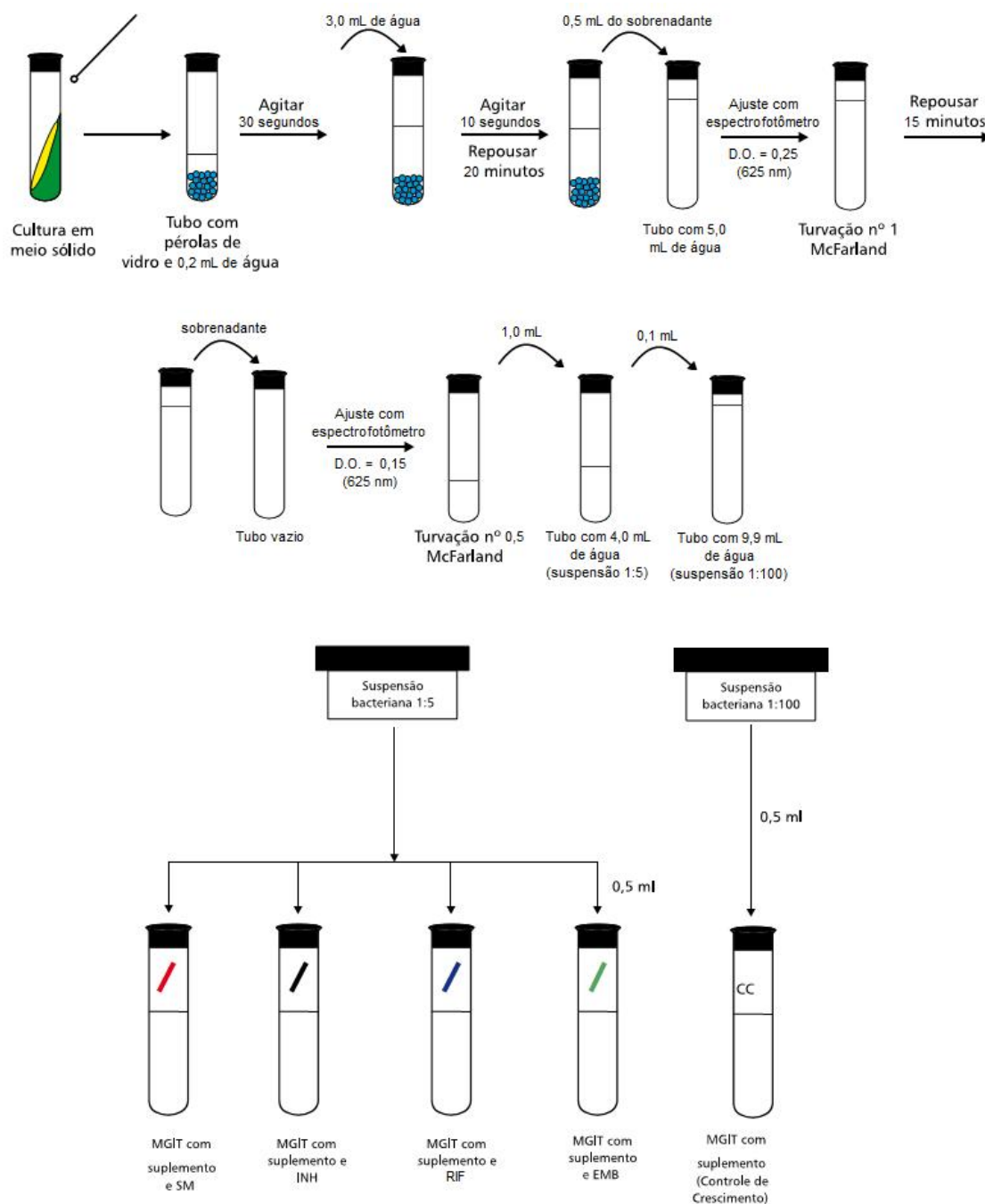
Todos os isolados que cresceram nos tubos controle foram transferidos para criotubos contendo um mL de meio Middlebrook 7H9 + 10% de glicerol e armazenadas a -70°C, sob condições estéreis, até o momento de seu uso no método do MGIT, quando foram descongeladas e subcultivadas em meio O-K e incubadas por 14 dias em estufa a 37°C para preparo do inóculo utilizado no teste.

4.7.2. Método do MGIT

Todo o método foi realizado seguindo o protocolo do fabricante (Figura 11) (Becton Dickinson IND. Cirúrgicas LTDA., EUA). Testaram-se os isolados das amostras clínicas para análise de concordância com os resultados do método proposto e as cepas referência Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™), Mtb H₃₇Rv-INH-R (ATCC® 35822™) e Mtb H₃₇Rv-RIF-R (ATCC® 35838™) para controle de qualidade interno do procedimento.

Primeiramente, identificou-se 5 tubos MGIT para cada teste. Um para controle e um para cada um dos 4 antimicrobianos (INH, RIF, EMB e SM). Adicionou-se 0,8 mL do suplemento BACTEC MGIT SIRE em cada tubo. Reconstituiu-se os antimicrobianos liofilizados fornecidos no kit com 4,0 mL de água deionizada estéril. Pipetou-se 0,1 mL das soluções antimicrobianas em seus respectivos tubos.

Depois, uma alça bacteriológica de cada subcultivo foi suspensa em 200 µL de água destilada estéril, em tubos com pérolas de vidro. A suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico (Scientific Industries/Vortex Genie 2) durante 30 segundos. Acrescentou-se 3 mL de água destilada estéril, agitou-se novamente por mais 10 segundos e então as suspensões foram deixadas em repouso por 20 minutos para decantação dos grumos. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante da suspensão foi transferido para um tubo sem pérolas de vidro com 5 mL de água destilada estéril para fazer uma suspensão com turbidez equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland. Após a obtenção das suspensões com D.O. equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland, as suspensões foram deixadas



Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008

Figura 11. Esquema do método do MGIT

novamente em repouso por mais 15 minutos para decantação dos grumos restantes. Logo depois, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril vazio para fazer uma suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. De acordo com padronizações realizadas no laboratório (dados não mostrados), o

padrão 0,5 da escala de McFarland possui uma D.O. de 0,15 ($\pm 0,01$) a 625nm (Espectrofotômetro Microprocessado Visível Digital Bivolt modelo Q 798DRM). Após a obtenção das suspensões com D.O. equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, diluiu-se 1 mL da suspensão ajustada em 4 mL de água destilada estéril (diluição 1:5) para fazer a suspensão de inóculo dos tubos teste. Dessa suspensão, diluiu-se 0,1 mL em 9,9 mL de água destilada estéril (diluição de 1:100) para preparar a suspensão de inóculo do tubo controle. Em seguida, 0,5 mL de cada inóculo foi adicionado em seus respectivos tubos. Finalmente, os tubos foram incubados no sistema automático BACTEC MGIT 960 até liberação dos resultados.

Para controle de qualidade da concentração dos inóculos, foram realizadas diluições seriadas de 10 e 100 vezes a partir do inóculo do tubo controle, em tubos de hemólise, transferindo-se 0,3 mL da diluição anterior para 2,7 mL de água destilada estéril.

Posteriormente, fizeram-se dois inóculos de 30 μ L com pipeta automática da suspensão de inóculo dos tubos teste, da suspensão de inóculo dos tubos controle e das duas diluições em placas de petri quadripartidas com meio Middlebrook 7H11 (Figura 12). Todas as placas foram incubadas por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias.

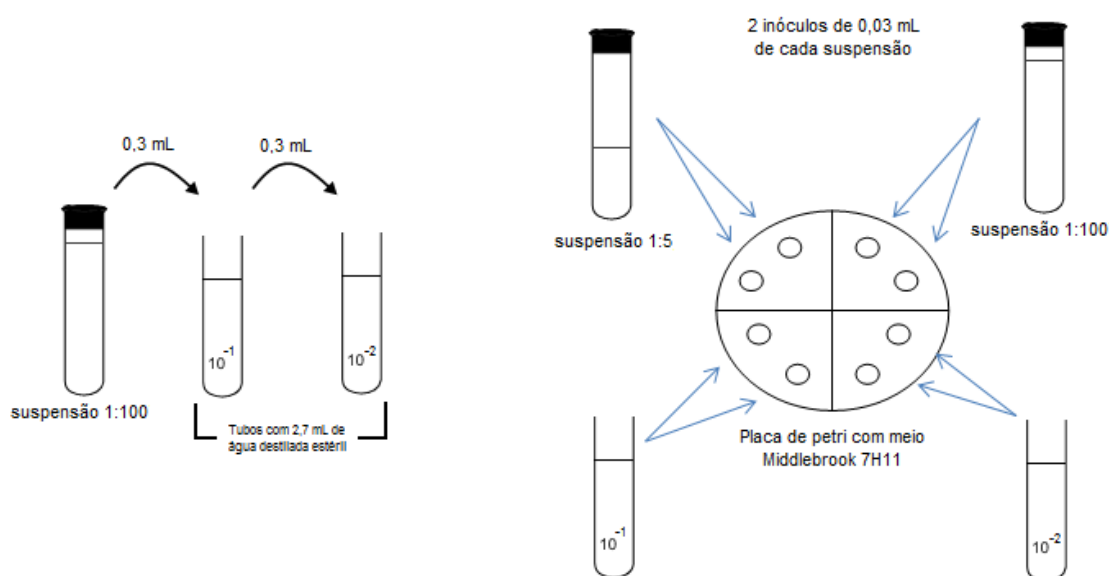


Figura 12. Esquema do controle das concentrações dos inóculos do método do MGIT

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL da suspensão 1:100} = \frac{\text{n}^\circ \text{ colônias em } 60 \mu\text{L} \times 16,7 (1000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L})}{\text{diluição}}$$

$$\text{UFC/mL da suspensão 1:5} = 100 \times \text{UFC/mL da suspensão 1:100}$$

Foram aprovadas pelo controle de qualidade interno todas as diluições 1:5 com concentração entre $1,4 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (parâmetros da instrução de uso do kit fornecida pelo fabricante). As cepas de referência Mtb H₃₇Rv (ATCC® 27294™), Mtb H₃₇Rv-INH-R (ATCC® 35822™) e Mtb H₃₇Rv-RIF-R (ATCC® 35838™) também foram avaliadas como controle de qualidade interno.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados específico, criado no programa Windows EXCEL 2010 e posteriormente analisados pelo programa STATA 9.0 (Stata Corporation, College Station, EUA).

Para avaliar o grau de concordância entre os métodos utilizou-se o teste Kappa com cálculo de intervalo de confiança 95% e seguindo a classificação de Altman (1991).

4.9. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes com o protocolo 323.121.

A dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi justificada por quatro razões: 1ª) só foram selecionadas amostras de pacientes que já possuíam diagnóstico confirmado de tuberculose, não havendo possibilidade de intervenção

neste; 2º) as amostras só foram selecionadas após finalizados todos os procedimentos de rotina, portanto utilizou-se apenas o resto das amostras coletadas pelos pacientes que seriam descartadas; 3º) Não foram utilizados quaisquer dados clínicos e/ou epidemiológicos dos pacientes e nem citou-se seus nomes; 4º) Não houve nenhum risco adicional aos pacientes.

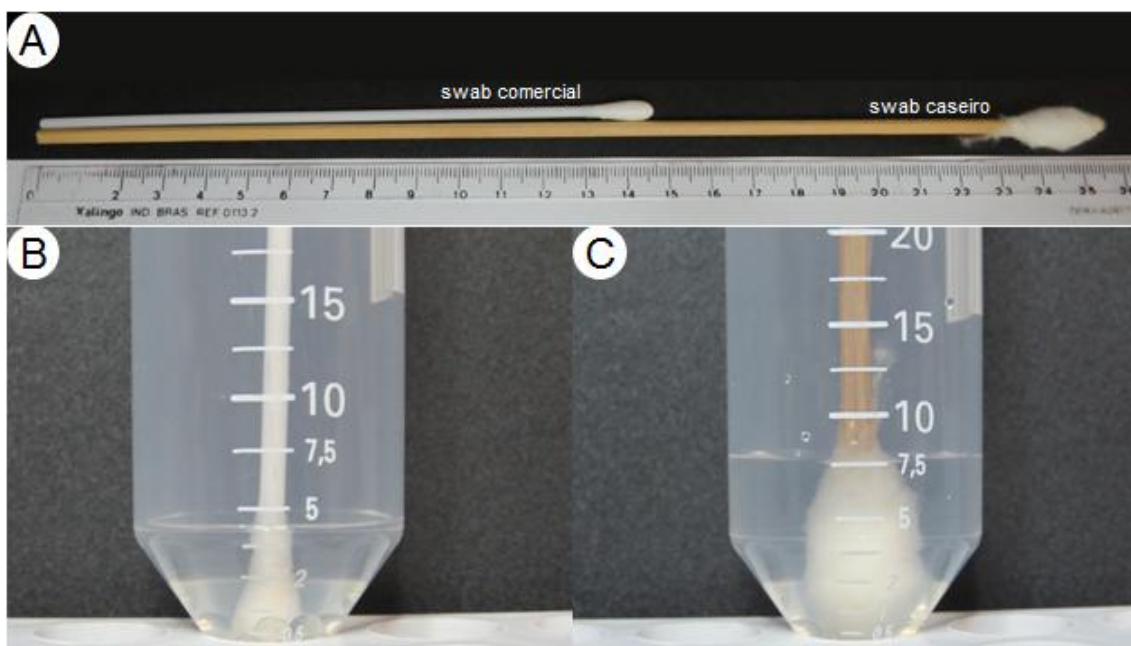
Resultados

5. RESULTADOS

5.1. 1ª FASE: DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO

5.1.1. Padronização do swab

A comparação inicial entre os dois tipos de swab demonstrou uma grande diferença tanto no tamanho das hastes dos swabs, quanto na quantidade de algodão em suas extremidades. O swab caseiro mostrou um comprimento de 25,6 cm, necessitando de pelo menos 7,5 mL de água destilada estéril para cobrir toda sua extremidade com algodão. O swab comercial apresentou um comprimento de 14,7 cm, tendo sua extremidade com algodão coberta com apenas 3,0 mL.



A) diferença de comprimento entre as duas marcas de swab: comercial = 14,7 cm / caseiro = 25,6 cm;
B e C) volumes necessários para cobrir as extremidades com algodão das duas marcas de swab, dentro dos tubos graduados de polipropileno, com capacidade de 50 mL, que foram utilizados no método proposto: comercial (B) = 3,0 mL / caseiro (C) = 7,5 mL.

Figura 13. Comparação visual entre os dois tipos de swab

5.1.1.1. Volume absorvido

Ao se comparar visualmente as duas marcas, observou-se que os swabs caseiros apresentavam muita variação na quantidade de algodão em suas pontas, diferentemente dos swabs comerciais que se apresentaram bem homogêneos nesse aspecto. Portanto, testou-se uma maior quantidade de swabs caseiros do que de swabs comerciais. No total, utilizou-se 150 swabs caseiros e 110 swabs comerciais.

Tabela 7. Volumes absorvidos pelos diferentes tipos de swab

Etapa	Swab	N	Volume Inicial	Tempo	Volumes absorvidos (média ± d. p.)
1ª Etapa	caseiro	30	3 mL	2 min	944 µL ± 95 µL
		30	3 mL	1 min	1160 µL ± 55 µL
		30	2 mL	2 min	1011 µL ± 149 µL
		30	2 mL	1 min	1009 µL ± 229 µL
		30	1 mL	tudo absorvido após em média 15 segundos	
	comercial	10	3 mL	2 min	190 µL ± 44 µL
		10	3 mL	1 min	163 µL ± 43 µL
		10	2 mL	2 min	139 µL ± 20 µL
		10	2 mL	1 min	171 µL ± 28 µL
		10	1 mL	2 min	168 µL ± 24 µL
		10	1 mL	1 min	163 µL ± 26 µL
2ª Etapa	comercial	10	2 mL	120 s	156 µL ± 13 µL
		10	2 mL	90 s	157 µL ± 25 µL
		10	2 mL	60 s	161 µL ± 48 µL
		10	2 mL	30 s	150 µL ± 19 µL
		10	2 mL	10 s	136 µL ± 22 µL

N = número de swabs testados; d. p. = desvio-padrão

Ambos os tipos absorveram sua capacidade máxima em poucos segundos. Levando em consideração todos os resultados, o swab caseiro absorveu em média 999 µL ± 200 µL e o swab comercial 160 µL ± 32 µL.

5.1.1.2. Volume liberado

Na primeira etapa do teste para determinação do volume liberado, os dois tipos de swab isolaram uma média entre 10 e 100 colônias na diluição de 10^{-4} , que foi a escolhida para a segunda etapa (Tabela 8).

Tabela 8. Limite de detecção dos dois tipos de swab

Swab	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
caseiro	133 colônias	16 colônias	1 colônia
	120 colônias	13 colônias	1 colônia
comercial	66 colônias	6 colônias	0 colônia
	80 colônias	20 colônias	0 colônia

Na segunda etapa, o volume liberado pelos swabs foi estimado a partir da média do número de colônias isoladas. O swab caseiro apresentou um volume liberado estimado de $87 \pm 27 \mu\text{L}$, enquanto que o do swab comercial foi estimado em $28 \pm 10 \mu\text{L}$.

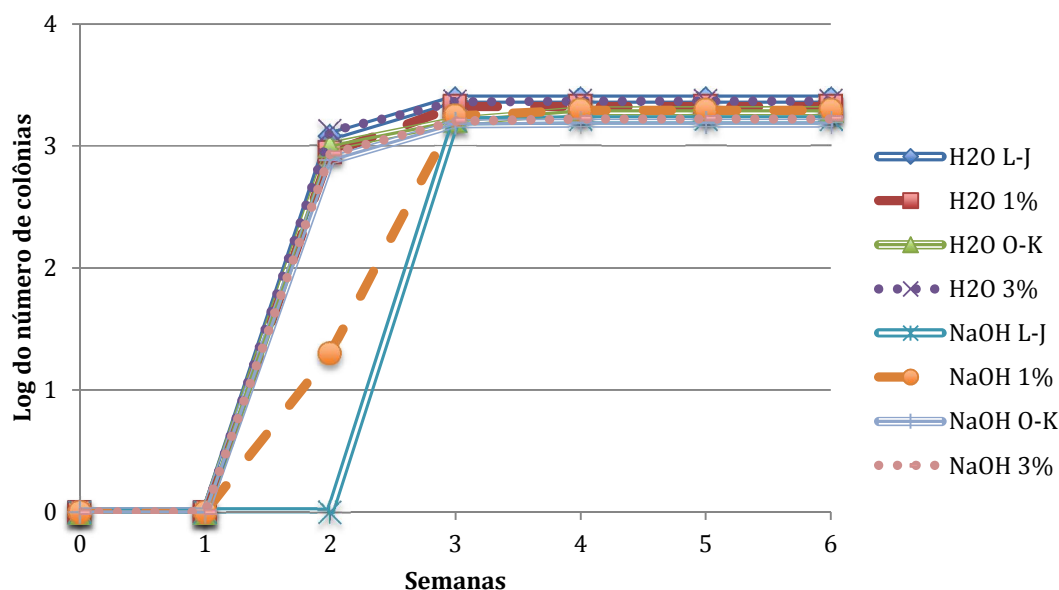
Tabela 9. Volumes liberados pelos diferentes tipos de swab (números expressos como média \pm desvio-padrão)

Instrumento	Número de colônias	Volume (μL)
Pipeta automática	46 ± 26	100
Swab caseiro	42 ± 26	87 ± 27
Swab comercial	13 ± 9	28 ± 10

5.1.2. Padronização do meio de cultura

5.1.2.1. Seleção do meio de cultura

Todos os quatro meios de cultura a base de ovo testados demonstraram crescimento similar quando inoculados com suspensão preparada em água destilada estéril. Porém, apenas os meios O-K e Ogawa 3% permitiram o mesmo crescimento com inóculos em água e em NaOH. Os meios L-J e Ogawa 1% apresentaram um crescimento mais lento a partir dos inóculos em NaOH em relação aos em água (Gráfico 1). Além disso, o aspecto das colônias nesses dois meios inoculados com NaOH mostrou-se diferente do aspecto clássico das colônias de Mtb. Elas não se apresentaram secas como nos outros meios (Figura 14). Porém, a partir da terceira semana, não houve nenhuma diferença em relação ao número de colônias isoladas.

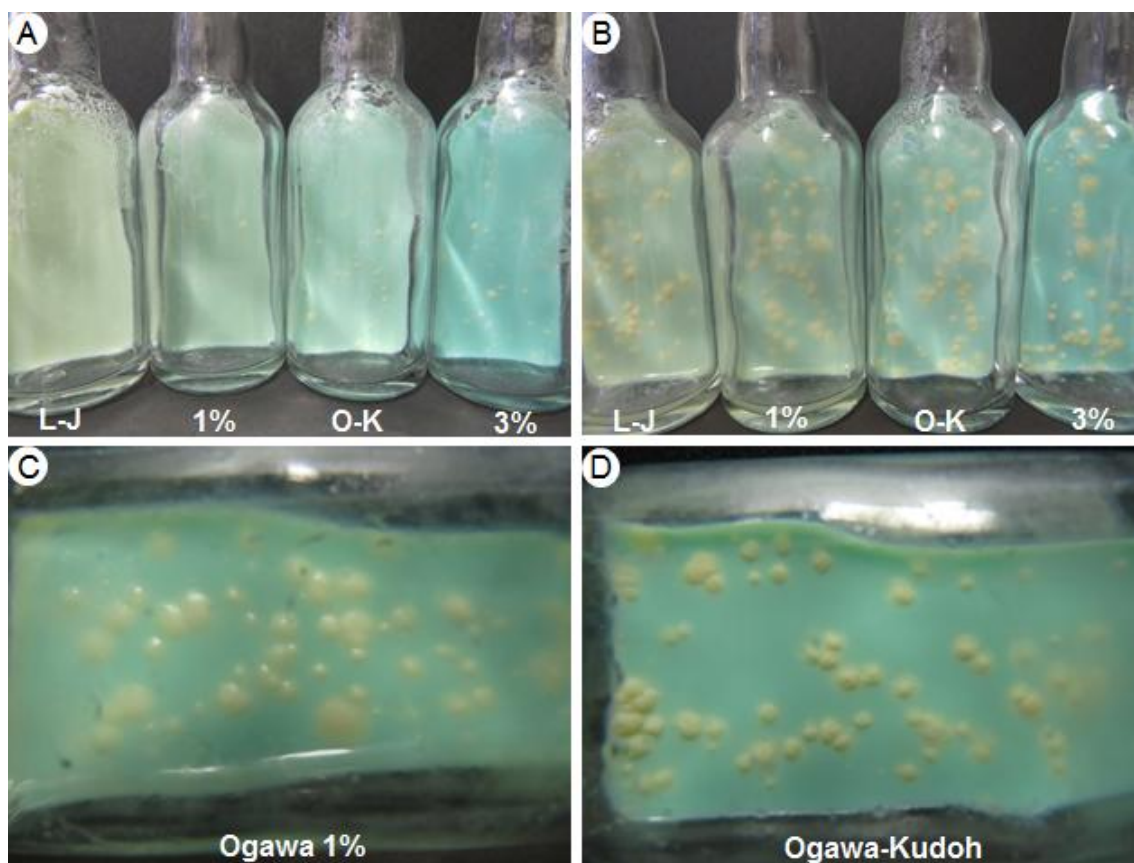


H2O: água destilada estéril; NaOH: hidróxido de sódio 4% m/v; L-J: meio Löwenstein-Jensen; 1%: meio Ogawa 1%; O-K: meio Ogawa-Kudoh; 3%: meio Ogawa 3%.

Gráfico 1. Curva de crescimento em diferentes meios de cultura a base de ovo realizada a partir de suspensões preparadas em água destilada estéril ou hidróxido de sódio 4% m/v.

5.1.2.2. Teste da atividade dos antimicrobianos no meio O-K

O teste demonstrou diferenças na atividade de cada antimicrobiano (Tabela 10). A INH, a RIF e o PNB, nas concentrações de 0,2 µg/mL, 40,0 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente, demonstraram excelente ação no meio O-K, conseguindo inibir completamente o crescimento do inóculo de todas as diluições, inclusive o do inóculo da suspensão com turvação equivalente ao padrão número 1,0 da escala de McFarland. O TCH, na concentração de 5,0 µg/mL, também demonstrou a ação desejada no meio O-K ao não inibir o crescimento das cepas de Mtb. Por outro lado, o EMB e a SM não apresentaram uma ação tão eficaz quanto os outros antimicrobianos. O EMB em ambas as concentrações testadas (2,0 e 2,5 µg/mL) não conseguiu inibir o crescimento de cepas sensíveis, mas alterou o aspecto das colônias, que se apresentaram puntiformes e esbranquiçadas (microcolônias). Apesar dessa diferença no aspecto, essas colônias que cresceram



A) crescimento na segunda semana; B) crescimento na terceira semana; C) crescimento do inóculo em NaOH no meio Ogawa 1% na terceira semana; D) crescimento do inóculo em NaOH no meio Ogawa-Kudoh na terceira semana; L-J = meio de cultura Löwenstein-Jensen; 1% = meio de cultura Ogawa 1%; O-K = meio de cultura Ogawa-Kudoh; 3% = meio de cultura Ogawa 3%.

Figura 14. Crescimento do Mtb nos diferentes meios de cultura a base de ovo

no meio com EMB mostraram-se ser bacilos álcool-ácido resistentes ao serem coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. A SM na menor concentração (4,0 µg/mL) não alterou o número e aspecto de colônias, mas retardou o crescimento, que com três semanas estavam menores do que as colônias do tubo controle. Porém, na maior concentração (10,0 µg/mL), além de retardar o crescimento, a SM também conseguiu inibir o crescimento dos inóculos de menor concentração.

Tabela 10. Análise da influência do meio O-K na atividade dos antimicrobianos frente a cepas de referência de Mtb e M. avium

Diluição	Cepa	CTRL	INH	RIF	EMB 2,0	EMB 2,5	SM 4,0	SM 10,0	PNB	TCH
McFarland 1,0	H ₃₇ Rv	3+	0	0	3 ^a	3 ^a	3 ^b	3 ^b	0	3+
	H ₃₇ Rv-INH-R	3+	3+	0	3 ^a	3 ^a	3 ^b	3 ^b	0	3+
	H ₃₇ Rv-RIF-R	3+	0	3+	3 ^a	3 ^a	3 ^b	0	0	3+
	M. avium	3+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3+	3+
10 ⁻³	H ₃₇ Rv	3+	0	0	3 ^a	3 ^a	3 ^b	4 ^b	0	3+
	H ₃₇ Rv-INH-R	124	131	0	35 ^a	0	37 ^b	0	0	127
	H ₃₇ Rv-RIF-R	46	0	24	56 ^a	0	36 ^b	0	0	54
	M. avium	3+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3+	3+
10 ⁻⁵	H ₃₇ Rv	5	0	0	1 ^a	0	2 ^b	0	0	10
	H ₃₇ Rv-INH-R	1	1	0	1 ^a	0	0	0	0	4
	H ₃₇ Rv-RIF-R	1	0	1	2 ^a	0	0	0	0	3
	M. avium	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	0
10 ⁻⁶	H ₃₇ Rv	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	H ₃₇ Rv-INH-R	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	H ₃₇ Rv-RIF-R	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	M. avium	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

3+ = crescimento conflente de colônias (incontáveis); a = microcolônias; b = colônias pequenas; NR = não realizado; CTRL = controle; 2,0 = 2,0 µg/mL; 2,5 = 2,5 µg/mL; 4,0 = 4,0 µg/mL; 10,0 = 10,0 µg/mL;

5.1.2.3. Análise da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura

O teste demonstrou diferenças na ação do EMB e da SM dependendo do meio de cultura em que estavam incorporados. Nos meios de cultura L-J e P, ambos os antimicrobianos demonstraram excelente ação, conseguindo inibir completamente o inóculo de todas as diluições, inclusive o inóculo da suspensão com turvação equivalente ao padrão número 1,0 da escala de McFarland. Porém, no meio O-K, os dois antimicrobianos demonstraram pouca ação, repetindo os mesmos resultados do teste anterior.

Tabela 11. Análise da interferência da concentração de fosfato monopotássico na atividade do EMB e da SM nos meios de cultura

Diluição	Meio	CTRL	EMB 2,0	SM 4,0
McFarland 1,0	L-J	3+	0	0
	P	3+	0	0
	O-K	3+	3 ^a	3 ^b
10 ⁻²	L-J	3+	0	0
	P	3+	0	0
	O-K	3+	3 ^a	3 ^b
10 ⁻⁴	L-J	37	0	0
	P	5	0	0
	O-K	24	40 ^a	17 ^b
10 ⁻⁵	L-J	3	0	0
	P	0	0	0
	O-K	4	5 ^a	1 ^b

3+ = crescimento conflente de colônias (incontáveis); a = microcolônias; b = colônias pequenas; CTRL = controle; 2,0 = 2,0 µg/mL; 4,0 = 4,0 µg/mL

5.1.3. Padronização da técnica do TSA

Foram selecionadas 42 amostras de escarro espontâneo (Tabela 12), sendo 7 (17%) com baciloscopia negativa que apresentavam suspeita de MDR-TB, 9 (21%) com baciloscopia 1+, 12 (29%) com baciloscopia 2+ e 14 (33%) com baciloscopia 3+. Dessas amostras, foram obtidas 5 (12%) culturas negativas, 25 (59%) cepas de Mtb sensíveis a todos os quatro antimicrobianos testados e 10 (24%) cepas de Mtb resistentes a INH e a RIF (MDR-TB), sendo que metade (12%) também era resistente a SM. Não foi isolada nenhuma cepa de Mtb resistente ao EMB. Além das cepas de Mtb, também foram isoladas duas (5%) cepas de micobactérias não causadoras de TB (MNT) identificadas na rotina do laboratório pelo método do PRA-hsp65 como *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* e *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

Tabela 12. Distribuição dos perfis dos isolados de acordo com os resultados da baciloscopia

Resultados da baciloscopia	Negativa	1+	2+	3+	Total
Perfis dos isolados	MDR 01 ^a MDR 03 NP 01 NP 02 NP 03 S 19 ^a	MDR 02 MNT 02 NP 04 S 04 S 05 S 09 ^a S 11 S 20 ^a S 23 ^a	MDR 05 MDR+ 03 MDR+ 04 MNT 01 S 01 S 02 S 03 ^a S 07 S 10 S 16 S 18 S 22	MDR 04 MDR+ 01 MDR+ 02 MDR+ 05 S 06 S 08 S 12 S 13 S 14 S 15 S 17 S 21 S 24 S 25	
Não positivaram (NP)	3	1	0	0	4
Sensíveis (S)	1	6	8	10	25
Resistentes a INH e RIF (MDR)	2	1	1	1	5
Resistentes a INH, RIF e SM (MDR+)	0	0	2	3	5
Micobactérias não causadoras de TB (MNT)	0	1	1	0	2
Total	6	9	12	14	41

Negativa = não foram encontrados BAAR em 100 campos; 1+ = foram encontrados de 10 a 99 BAAR em 100 campos; 2+ = foram encontrados em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados; 3+ = foram encontrados em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados; a = positivaram com menos de 100 colônias no tubo controle

5.1.3.1. Determinação da diluição

O teste das diluições com as amostras clínicas demonstrou a mesma diferença de ação dos antimicrobianos observada no teste com as cepas de referência (Tabela 13, Tabela 14 e Figura 15). A INH e a RIF conseguiram inibir completamente o crescimento de todos os inóculos sensíveis, inclusive dos inóculos diretos das amostras, e não interferiram no crescimento de nenhum inóculo resistente, mesmo o dos mais diluídos. O EMB, em ambas as concentrações de 2,0 e 2,5 µg/mL, não conseguiu inibir o crescimento de nenhum inóculo sensível, mas

Tabela 13. Influência da diluição no perfil de sensibilidade ou resistência dos isolados de Mtb sensíveis

Baciloscopia	Antimicrobiano							
	Concentração (µg/mL)							
	Diluição							
		CTRL	INH	RIF	EMB	EMB	SM	SM
			0,2	40,0	2,0	2,5	4,0	10,0
Negativa (N = 1)	amostra	1-20	0	0	1-20	NR	1-20	NR
	10 ⁻¹	0	0	0	0	NR	0	NR
	10 ⁻²	0	0	0	0	NR	0	NR
	10 ⁻³	0	0	0	0	NR	0	NR
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	NR	0	NR
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	NR	0	NR
1+ (N = 4)	amostra	+	0	0	+	+	+	0
	10 ⁻¹	1-20	0	0	1-20	1-20	1-20	0
	10 ⁻²	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0
2+ (N = 4)	amostra	+++	0	0	+++	+++	+++	0
	10 ⁻¹	+++	0	0	+++	+++	+++	0
	10 ⁻²	++	0	0	++	++	++	0
	10 ⁻³	+	0	0	+	+	+	0
	10 ⁻⁴	1-20	0	0	1-20	1-20	1-20	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0
3+ (N = 9)	amostra	+++	0	0	+++	+++	+++	0
	10 ⁻¹	+++	0	0	+++	+++	+++	0
	10 ⁻²	+++	0	0	+++	+++	+++	0
	10 ⁻³	++	0	0	++	++	++	0
	10 ⁻⁴	+	0	0	+	+	+	0
	10 ⁻⁵	1-20	0	0	1-20	1-20	1-20	0

CTRL = controle; Negativa = não foram encontrados BAAR em 100 campos; 1+ = foram encontrados de 10 a 99 BAAR em 100 campos; 2+ = foram encontrados em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados; 3+ = foram encontrados em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados; 1-20 = menos de 20 colônias; + = de 20 a 100 colônias; ++ = mais de 100 colônias separadas; +++ = colônias confluentes (tapete); NR = não realizado; N = número de testes.

alterou o aspecto das colônias para microcolônias. A SM na concentração de 4,0 µg/mL também não conseguiu inibir o crescimento dos inóculos, apenas retardou o crescimento, fazendo com que as colônias estivessem pequenas na terceira semana

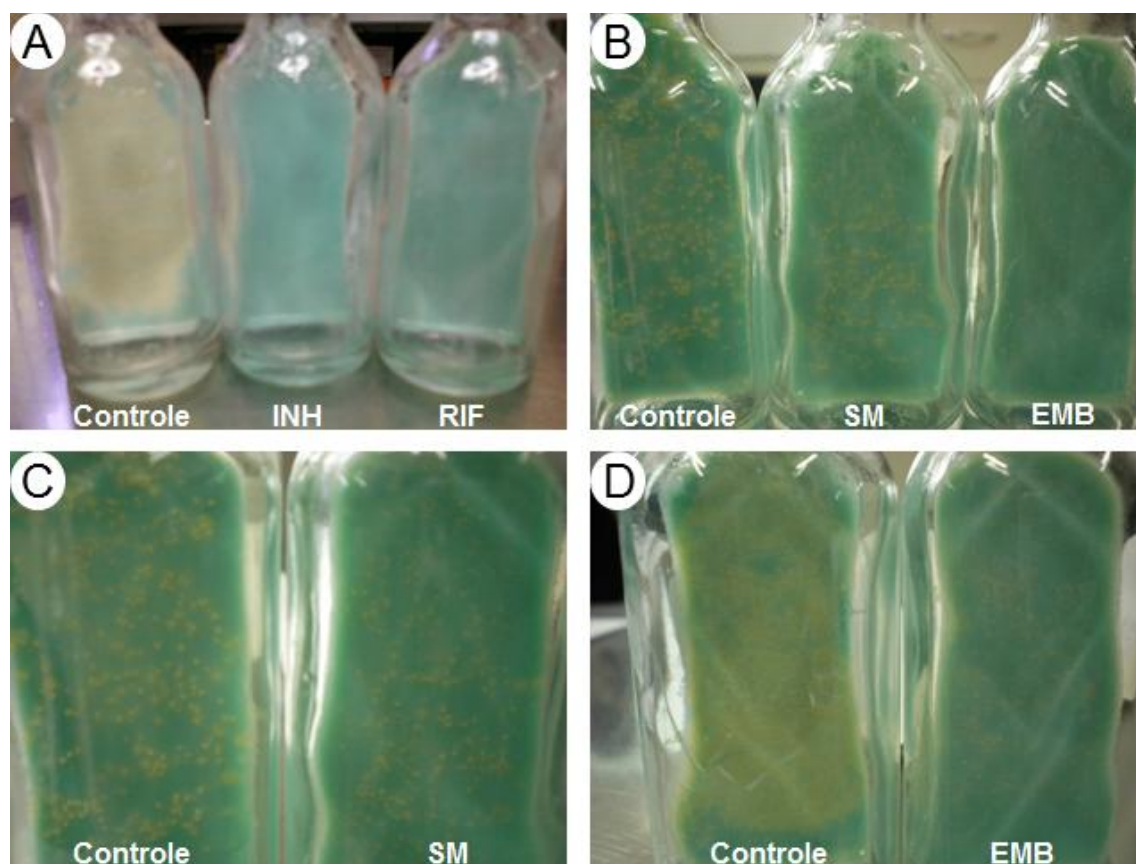
Tabela 14. Influência da diluição no perfil de sensibilidade ou resistência dos isolados de Mtb resistentes

Baciloscopia	Concentração (µg/mL)	Antimicrobiano				
		CTRL	INH	RIF	SM	SM
	Diluição		0,2	40,0	4,0	10,0
Negativa (N = 1)	amostra	1-20	1-20	1-20	1-20	1-20
	10 ⁻¹	0	0	0	0	0
	10 ⁻²	0	0	0	0	0
	10 ⁻³	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
1+ (n = 1)	amostra	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	1-20	1-20	1-20	1-20	1-20
	10 ⁻²	0	0	0	0	0
	10 ⁻³	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
2+ (N = 3)	amostra	+++	+++	+++	+++	+++
	10 ⁻¹	+++	+++	+++	+++	+++
	10 ⁻²	++	++	++	++	++
	10 ⁻³	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁴	1-20	1-20	1-20	1-20	1-20
	10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
3+ (N = 2)	amostra	+++	+++	+++	+++	+++
	10 ⁻¹	+++	+++	+++	+++	+++
	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++
	10 ⁻³	++	++	++	++	++
	10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	1-20	1-20	1-20	1-20	1-20

CTRL = controle; Negativa = não foram encontrados BAAR em 100 campos; 1+ = foram encontrados de 10 a 99 BAAR em 100 campos; 2+ = foram encontrados em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados; 3+ = foram encontrados em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados; 1-20 = menos de 20 colônias; + = de 20 a 100 colônias; ++ = mais de 100 colônias separadas; +++ = colônias confluentes (tapete); NR = não realizado

de incubação. Porém, a SM na concentração de 10,0 µg/mL conseguiu inibir completamente o crescimento de todos os incóculos sensíveis, inclusive dos

inóculos diretos das amostras, e não interferiu no crescimento de nenhum inóculo resistente, mesmo o dos mais diluídos.



A) Crescimento confluento no tubo controle, que foi completamente inibido nos tubos com INH e com RIF; B) comparação do aspecto do crescimento normal em meio O-K sem antimicrobiano (Controle), das colônias pequenas no meio com SM 4,0 µg/mL e das microcolônias no meio com EMB 2,0 4,0 µg/mL; C) comparação entre o crescimento normal e as colônias pequenas; D) comparação entre o crescimento normal e as microcolônias.

Figura 15. Resultado de um TSA de um isolado de Mtb

5.1.3.2. Determinação do tempo de incubação das culturas

Entre as 37 culturas que positivaram até a sexta semana, o tempo de positividade predominante foi de três semanas, mas houve algumas exceções. A *M. abscessus* subsp. *abscessus* positivou na primeira semana (3%). Seis Mtb positivaram na segunda semana (16%), sendo que quatro foram provenientes de amostras com de baciloscopia 3+ e duas de amostras com baciloscopia 1+. Duas

Mtb (uma baciloscopia negativa e uma baciloscopia 3+) e a *M. avium* cresceram apenas na quarta semana (8%). E todos os outros 27 isolados positivaram na terceira semana (73%).

Além dessa diferença no tempo de positivação, também houve diferença de resultado no crescimento dos tubos com RIF (40,0 µg/mL) e SM (10,0 µg/mL). A partir da quinta semana, isolados sensíveis cresceram nestes meios de cultura.

5.1.3.3. Determinação da taxa de contaminação

Para o cálculo da taxa de contaminação considerou-se apenas os tubos inoculados diretamente com as amostras. No total, dos 243 tubos inoculados diretamente com a amostra, 8 contaminaram, o que deu uma taxa de contaminação igual a 3,29%.

5.2. 2ª FASE: COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DO MGIT (PADRÃO-OURO)

Os resultados considerados viáveis obtidos para INH, RIF, EMB e SM foram comparados com o método do MGIT para análise de concordância. E os resultados do PNB e do TCH foram comparados com a identificação pela técnica indireta.

5.2.1. INH

Foram realizados 41 testes com a INH na concentração de 0,2 µg/mL. Porém, duas culturas contaminaram, duas eram de MNT, quatro não cresceram e cinco tiveram resultados inválidos, o que reduziu o número de testes viáveis para 28.

No final, a INH apresentou um índice kappa igual a 1,000 (concordância muito boa) com o padrão-ouro durante todas as 6 semanas. Nenhum dos 28 testes apresentou resultado falso.

INH 0,2 µg/mL		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	18	0
	R	0	10

Kappa = 1,000 (muito boa)

5.2.2. RIF

Foram realizados 41 testes com a RIF na concentração de 40,0 µg/mL. Porém, uma cultura contaminou, duas eram de MNT, quatro não cresceram e cinco tiveram resultados inválidos, o que reduziu o número de testes viáveis para 29.

No final, a RIF apresentou uma concordância dependente do tempo de leitura. Com a leitura realizada entre 21 e 28 dias, o índice kappa foi igual a 1,00 (concordância muito boa), não apresentando nenhum resultado falso. Mas, a partir da quinta semana, o índice kappa passou a ser igual a 0,383 (concordância regular) devido ao aparecimento de resultados falso-resistentes.

RIF 40,0 µg/mL (entre 21 e 28 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	19	0
	R	0	10

Kappa = 1,000 (muito boa)

RIF 40,0 µg/mL (a partir de 35 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	9	0
	R	10	10

Kappa = 0,383 (regular)

5.2.3. EMB

Foram realizados 22 testes com o EMB na concentração de 2,0 µg/mL e 19 testes na concentração de 2,5 µg/mL. Apenas uma cultura não cresceu ao testarmos a concentração de 2,0 µg/mL, totalizando 21 testes viáveis. Porém, ao testar a concentração de 2,5 µg/mL, duas culturas contaminaram, duas eram de MNT, três não cresceram e dois testes deram resultado inválido até a quarta semana, mas a partir da quinta passaram para resistente. Portanto o número de testes para a concentração de 2,5 µg/mL foi de 10 até a quarta semana, mas na quinta semana passou para 12.

No final, o EMB, em ambas as concentrações, apresentou índice kappa igual a 0,000 (concordância pobre). E mesmo que a concentração mais alta tenha fornecido mais resultados verdadeiros, não foi o suficiente para melhorar a concordância.

EMB 2,0 µg/mL		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	0	0
	R	21	0

Kappa = 0,000 (pobre)

EMB 2,5 µg/mL (entre 21 e 28 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	5	0
	R	5	0

Kappa = 0,000 (pobre)

EMB 2,5 µg/mL (a partir de 35 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	2	0
	R	10	0

Kappa = 0,000 (pobre)

5.2.4. SM

Foram realizados 21 testes com a SM na concentração de 4,0 µg/mL e 19 testes na concentração de 10,0 µg/mL. Porém, ao testar a concentração de 10,0 µg/mL, duas culturas eram de MNT, três não cresceram e três testes deram resultado inválido. Todos os 21 testes na concentração de 4,0 µg/mL foram viáveis, mas apenas 11 testes na concentração de 10,0 µg/mL foram viáveis.

No final, a SM, na concentração de 4,0 µg/mL, apresentou um índice kappa igual 0,017 (concordância pobre). Por outro lado, a SM, na concentração de 10,0 µg/mL, apresentou uma concordância dependente do tempo de leitura. Com a leitura realizada entre 21 e 28 dias, o índice kappa foi igual a 1,000 (concordância muito boa), não apresentando nenhum resultado falso. Mas, a partir da quinta semana, o índice kappa passou a ser igual a 0,313 (concordância regular) devido a ao aparecimento de resultados falso-resistentes.

SM 4,0 µg/mL		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	1	0
	R	17	3

Kappa = 0,017 (pobre)

SM 10,0 µg/mL (entre 21 e 28 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	9	0
	R	0	2

Kappa = 1,000 (muito boa)

SM 10,0 µg/mL (a partir de 35 dias)		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	5	0
	R	4	2

Kappa = 0,313 (regular)

5.2.5. PNB

Foram realizados 19 testes com o PNB na concentração de 500,0 µg/mL, sendo 13 sensíveis e 2 resistentes. Porém, uma cultura contaminou, quatro não cresceram e três tiveram resultados inválidos, o que reduziu o número de testes viáveis para 11.

No final, o PNB apresentou um índice kappa igual a 1,000 (concordância muito boa). Nenhum dos 11 testes apresentou resultado falso.

PNB 500,0 µg/mL		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	9	0
	R	0	2

Kappa = 1,000 (muito boa)

5.2.6. TCH

Foram realizados 19 testes com o TCH na concentração de 5,0 µg/mL. Porém, a cultura de três amostras contaminou, duas culturas eram de MNT, quatro não cresceram e o resultado de um teste foi inválido, o que reduziu o número de testes viáveis para 9.

No final, a concordância do método proposto com o padrão-ouro para o TCH não pôde ser calculado por falta de resultados sensíveis.

TCH 5,0 µg/mL		Padrão-ouro	
		S	R
Método proposto	S	0	0
	R	0	9

Kappa = não calculável

Discussão

6. DISCUSSÃO

A resistência bacteriana representa um grande obstáculo para o controle da tuberculose em todo o mundo e o desenvolvimento de novas metodologias para a sua detecção tem se tornado um grande desafio. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; PONTALI, MATTEELLI e MIGLIORI, 2013). Os TSA fenotípicos disponíveis atualmente, embora eficientes, apresentam elevado custo financeiro, fornecem resultados somente após vários dias e necessitam de profissionais especializados para serem realizados (PALOMINO, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Com base nesta premissa, nos propusemos a desenvolver e padronizar um método fenotípico direto para determinação da sensibilidade do Mtb a antimicrobianos de primeira linha do tratamento da tuberculose. Os resultados e os diversos aspectos relacionados a sua padronização serão discutidos a seguir. Para tornar esta discussão mais dinâmica e didática elaboramos uma sequência de perguntas na ordem cronológica do desenvolvimento do método.

Como deve ser o swab indicado para o novo método?

Inicialmente, foram analisados dois tipos diferentes de swab, um caseiro e um comercial. O swab caseiro mostrou-se impróprio para o método por ser muito grande, o que exigiu um volume maior para cobrir a ponta com algodão, e por absorver um grande volume. Considerando-se que no método se utilizam sete swabs, que cada swab caseiro absorve aproximadamente 1,0 mL e que é necessário pelo menos 7,5 mL para se cobrir a ponta com algodão, seriam necessárias amostras com quase 15 mL de volume, o que não é uma realidade para as coletas pontuais de escarro, que fornecem um volume em média de 5,0 mL. Teria que ser necessário fazer um pool de escarro para realização do exame, o que seria um incômodo maior para os pacientes do que realizar apenas uma coleta pontual. Por outro lado, o swab comercial, por ser pequeno e absorver um volume quase dez vezes menor do que o swab caseiro, mostrou-se ser a melhor alternativa, exigindo um volume de apenas 4,0 mL de amostra. Além disso, levando-se em consideração que o CLSI (2011) recomenda cuidado crítico em relação ao tamanho do inóculo

para não alterar a interpretação do teste, o pequeno volume médio de 28 µL liberado pelo swab comercial foi considerado ideal para inocular sem diluir amostras mais concentradas, como por exemplo os escarros com resultado de baciloscopia igual a 3+.

Qual seria o meio de cultura mais indicado para o novo método?

Foram avaliados quatro meios de cultura a base de ovo para saber se conseguiriam neutralizar o inóculo com NaOH, que é o pré-requisito essencial para a técnica de O-K. Dos quatro, o meio L-J apresentou o maior tempo para positividade (3 semanas), enquanto que os meios Ogawa 1%, O-K e Ogawa 3% positivaram em menos tempo (2 semanas). Mas, apesar do meio Ogawa 1% ter positivado na segunda semana, juntamente com os meios O-K e Ogawa 3%, este demonstrou uma redução significativa no número de colônias isoladas. Além disso, apesar de na terceira semana não haver diferença no número de colônias isoladas em nenhum dos quatro meios de cultura, o aspecto mucoso, liso e brilhante das colônias identificadas como Mtb nos meios L-J e Ogawa 1% não é característico de colônias de Mtb que deveriam ser secas, rugosas e opacas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), que foi o aspecto observado nas colônias isoladas nos meios O-K e Ogawa 3%.

Quando Kudoh & Kudoh (1974) padronizaram o método para exame de cultura de O-K, o meio L-J foi comparado aos meios O-K e Ogawa 3% em relação à neutralização de um inóculo de NaOH. O meio L-J mostrou-se inadequado, por não neutralizar o NaOH e diminuir o tempo de positividade e a quantidade de Micobactérias isoladas. No nosso estudo, observamos a diminuição do tempo de positividade relatada por Kudoh e Kudoh, porém não observamos a redução do número de colônias isoladas. Além disso, observamos uma alteração no aspecto das colônias de Mtb que não foi relatada por estes autores. Provavelmente por apresentar um pH mais neutro (pH 7,2), o meio L-J não consiga neutralizar rapidamente o inóculo com NaOH, prejudicando o crescimento das Micobactérias. O que também justificaria os resultados obtidos com o meio Ogawa 1% (pH 6,8), que contrastam com os meios O-K (pH 6,4) e Ogawa 3% (pH 6,3).

Como o tempo de detecção e o aspecto macroscópico das colônias são de fundamental importância para o novo método, os meios L-J e Ogawa 1% se

mostraram inadequados, enquanto que os meios O-K e Ogawa 3% foram considerados adequados, assim como foi concluído por Kudoh e Kudoh. Entretanto, por utilizar menores quantidades dos reagentes, o meio O-K possui um custo de produção um pouco menos elevado do que o meio Ogawa 3%. Portanto, para que seja o mais acessível possível, padronizou-se o meio O-K para o método proposto.

A composição química do meio O-K interfere na ação dos fármacos contra TB?

É sabido que a composição química dos meios de cultura pode interferir na ação dos antimicrobianos, o que faz com a concentração crítica de um determinado antimicrobiano em um meio de cultura seja diferente em outro meio de cultura (KENT e KUBICA, 1985; CLSI, 2005; CLSI, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Levando em consideração que os únicos meios de cultura a base de ovo cujas concentrações críticas para os fármacos contra a tuberculose foram padronizadas são o L-J (CANETTI *et al.*, 1963; KENT e KUBICA, 1985; CLSI, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009) e o Ogawa 1% (TANOUE, MITARAI e SHISHIDO, 2002; TAKAKURA *et al.*, 2005), justamente os dois meios que se mostraram inadequados para se realizar um inóculo com NaOH. Portanto, considerando-se que o meio O-K foi padronizado para o método e que não existem concentrações críticas dos fármacos padronizadas para este meio, decidimos avaliar a atividade da INH, da RIF, do EMB e da SM no meio O-K.

Os resultados mostraram que as concentrações críticas padronizadas para o método das proporções no meio L-J de 0,2 µg/mL de INH e 40,0 µg/mL de RIF (CANETTI *et al.*, 1963) inibiram o crescimento de cepas sensíveis e permitiram o crescimento de cepas resistentes no meio O-K. Tanoue, Mitarai e Shishido (2002) testaram estas concentrações pelo método das proporções no meio Ogawa 1%, e também encontraram uma concordância muito boa com o mesmo método no meio L-J, o que indica que esses dois fármacos não sofrem interferência dos componentes dos meios a base de ovo.

Por outro lado, o EMB e a SM demonstraram sofrer interferência no meio O-K. O EMB, em ambas as concentrações testadas, não inibiu o crescimento de cepas sensíveis, porém alterou o aspecto das colônias, fazendo com que o *Mtb* formasse colônias lisas, puntiformes e esbranquiçadas, denominadas microcolônias. De

acordo com o CLSI (2011), a presença de microcolônias pode representar resistência verdadeira ou parcial, ou pode ainda ser resultado da degradação do EMB, seguida de um crescimento de organismos sensíveis. O CLSI (2011) afirma ainda que o significado verdadeiro das microcolônias é desconhecido e que sua frequência pode variar de um laboratório para o outro. Uma avaliação multicêntrica do EMB em testes de sensibilidade realizada por MADISON e colaboradores (2002) concluiu que as microcolônias que aparecem no método das proporções em ágar não aparentam ser indicativo de resistência, pois ao se repetir este método ou mesmo ao se comparar com um método radiométrico, a resistência não é confirmada. Portanto, como todos os nossos testes sensíveis propiciaram o surgimento de microcolônias nos tubos com EMB, também acreditamos que essas microcolônias não sejam indicativos de resistência, mas o indicativo de degradação do fármaco, o que também explicaria a redução da atividade da SM.

Qual componente químico do meio O-K interfere na ação do EMB e da SM?

Já foi relatado que algumas proteínas dos ovos e o fosfato afetam as atividades das drogas anti-TB (TANOUE, MITARAI e SHISHIDO, 2002). Como o teor de ovos do meio L-J é menor do que o dos meios Ogawa, isso poderia explicar a diferença de atividade dos antimicrobianos encontrada, porém o teor de ovos do meio Ogawa 1% é igual ao do meio O-K, e mesmo assim o EMB e a SM exibiram diferentes atividades nos dois meios, o que descarta a possibilidade da interferência dos ovos. E como o fosfato monopotássico é o componente cuja concentração mais difere nos quatro meios a base de ovo, decidimos analisar a sua influência nas atividades do EMB e da SM.

Nossos resultados mostraram uma relação inversamente proporcional entre a concentração do fosfato monopotássico no meio de cultura e a atividade exercida pelo EMB e pela SM. Tamura e Takano (1968) relataram uma atividade mais forte do EMB em pH 7,2 do que em pH 6,8. Tanoue, Mitarai e Shishido (2002) testaram no meio Ogawa 1% (pH 6,8) as concentrações críticas do EMB e da SM padronizadas para L-J (pH 7,2), e também encontraram uma menor atividade dos dois fármacos no meio Ogawa 1%. Como o pH do meio O-K (pH 6,4) é ainda menor

do que o do meio Ogawa 1%, isso poderia explicar a diminuição na atividade de ambos os fármacos.

Há necessidade de se diluir a amostra para realização da técnica?

As diluições da amostra que devem ser realizadas para os métodos diretos clássicos são determinadas pelo resultado da baciloscopia (CANETTI *et al.*, 1963; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Por causa disso, muitos laboratórios não realizam os testes de sensibilidade diretos, porque não é considerado prático realizar a baciloscopia como uma rotina antes da inoculação no meio de cultura (CANETTI *et al.*, 1963). Portanto, analisamos se haveria realmente a necessidade de se fazer essas diluições.

De acordo com os nossos resultados, a INH, a RIF e o PNB inibiram completamente o crescimento de cepas sensíveis, mesmo provenientes de inóculos bastante concentrados, como as amostras 3+ e a suspensão com D.O. equivalente ao padrão número 1,0 de McFarland. Como o teste da nitrato redutase descrito por Angeby, Klintz e Hoffner (2002) utiliza como inóculo no meio L-J a suspensão com D.O. equivalente ao padrão número 1,0 de McFarland e possui uma concordância muito boa com o padrão-ouro, essa completa inibição por parte desses fármacos já era esperada.

Em relação às cepas resistentes, observou-se em todos os testes um crescimento igual nos tubos com antimicrobianos e nos tubos controles. Esse achado pode ter sido ocasionado pelo pequeno número de amostras com cepas resistentes testadas, mas também pelo fato de que ao se utilizar a amostra sem fazer diluições, o inóculo é mais representativo da população microbiana do hospedeiro do que nos métodos indiretos, nos quais já houve um crescimento prévio em meio de cultura, onde há uma seleção da população micobacteriana (CLSI, 2011). Além disso, ao se retirar uma pequena quantidade de colônias do meio de cultura para realização dos testes indiretos, pode-se diminuir ainda mais o número de bacilos resistentes na população selecionada. Considerando-se ainda as diluições necessárias, a população testada nos métodos indiretos pode não ser mais

tão representativa da população original do hospedeiro, o que levaria a uma redução na detecção de colônias resistentes.

Diante do exposto, acreditamos que não há necessidade em se realizar as diluições. Mas devemos chamar atenção a uma possível limitação deste teste que se dá no caso de amostras paucibacilares. Tais amostras não ofereceram um isolamento maior que 100 colônias nos tubos controle, o que invalidou os resultados. Por isso acreditamos que para realização do teste deve-se orientar adequadamente o paciente para que se colete uma amostra de boa qualidade.

Qual deve ser o tempo de incubação para se fazer a leitura do novo método?

Nossos resultados demonstraram estabilidade da RIF e da SM até 28 dias de incubação. Após esse tempo, ambos os antibióticos apresentaram redução em suas atividades. Esses achados estão de acordo com os dados relatados por Yu e colaboradores (2011), que demonstraram a instabilidade da RIF em meio L-J na temperatura de 37°C. Após uma semana 50% da RIF havia sido degradada e após 3 semanas não era mais detectada no meio de cultura. Essa instabilidade a altas temperaturas explicaria o surgimento tardio de colônias no meio de cultura com os antimicrobianos, já que os tubos são incubados em estufas a 37°C por longo período de tempo. Portanto, com base nos nossos resultados e no estudo realizado por Yu e colaboradores (2011), os testes não deveriam ser incubados por mais de 28 dias.

Por ser um método direto, a contaminação não seria um obstáculo para realização do método?

A contaminação da cultura por outros microrganismos, como bactérias e fungos, presentes na amostra de escarro limitam a utilização da cultura para o diagnóstico da tuberculose. Peres e colaboradores (2011) relataram uma contaminação de 9,0% das culturas inoculadas pela técnica de O-K com amostras de escarro espontâneo coletadas após o enxágue oral de rotina com água. Por outro lado, Rivas e colaboradores (2010) relataram uma contaminação de 4,6%, encontrada quando avaliaram o desempenho da técnica de O-K em um laboratório

de larga escala de trabalho. Recentemente, Palaci e colaboradores (2013) relataram uma contaminação de 3,8% ao avaliar a contribuição da técnica de O-K para o diagnóstico da tuberculose pulmonar no Brasil. Como o Ministério da Saúde (2008) considera aceitável para exames de cultura pelo método de Ogawa-Kudoh uma taxa de contaminação entre 3% e 5%, a taxa de contaminação de 3,29% encontrada no nosso estudo é considerada aceitável. Também devemos ressaltar que a contaminação de uma pequena porcentagem dos testes pode ser uma limitação para utilização do método proposto, assim como é esperado para as culturas de diagnóstico pelo método de O-K.

Qual é a concordância do método desenvolvido com o método considerado padrão-ouro?

Considerando-se o teste com swab comercial, em meio O-K, sem diluição da amostra e com leitura entre 21 e 28 dias, o método desenvolvido apresentou uma concordância muito boa com o padrão ouro para os fármacos INH, RIF, SM e PNB nas respectivas concentrações de 0,2 µg/mL, 40,0 µg/mL 10,0 µg/mL e 500,0 µg/mL. Portanto o método desenvolvido demonstrou uma concordância com o padrão-ouro equivalente a métodos fenotípicos consagrados na literatura, como por exemplo o teste da nitrato redutase (ANGEBY, KLINTZ e HOFFNER, 2002).

A concordância do método proposto para o TCH 5,0 µg/mL não pôde ser calculada por não disponibilizarmos de amostras com cepas sensíveis a este fármaco, porém todos os resultados obtidos foram verdadeiros em relação ao padrão-ouro. Considerando que o TCH já é padronizado para o meio O-K (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), acreditamos que o método possa vir a apresentar uma concordância muito boa se também for avaliado para espécies sensíveis ao TCH, como por exemplo *M. bovis*, *M. africanum* tipo I e *M. microti* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Para o EMB, o método apresentou uma concordância pobre com o MGIT. De acordo com Madison e colaboradores (2002), a reprodutibilidade dos resultados dos testes de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* para o EMB sempre foi uma dificuldade por uma variedade de razões, incluindo a estreita faixa entre a

concentração crítica do EMB e a MIC de cepas sensíveis, e a presença de microcolônias. Obtivemos vários resultados falso-resistentes devido às microcolônias, o que está de acordo com os achados de Madison e colaboradores (2002) que relataram presença de microcolônias pelo método das proporções em meio a base de ágar em 80,4% dos testes sensíveis ao EMB determinados pelo método radiométrico. Acreditamos que o pH de 6,4 do meio O-K contribua para a degradação deste fármaco, o que, de acordo com o CLSI (2011), contribuiria para o aparecimento das microcolônias.

Com base nos resultados desse estudo acreditamos que o método desenvolvido apresenta grandes vantagens que possibilitam a sua implantação em uma rotina de diagnóstico de resistência micobacteriana. Os reagentes utilizados para produção do meio de cultura e o material utilizado na execução do método são de baixo custo. A técnica para sua execução é muito simples, o que dispensa profissionais especializados. Ele não é um teste rápido como os métodos genotípicos, mas, por ser direto, consegue reduzir bastante o tempo entre a entrega da amostra pelo paciente e a leitura do resultado do teste, quando comparado com os métodos indiretos. O método dispensa equipamentos sofisticados, como centrífugas e cabines de segurança biológica, podendo ser realizado em locais com uma estrutura física mais simples devido ao baixo risco biológico envolvido. No geral, o método desenvolvido parece bastante promissor e acessível para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, os quais são altamente endêmicos para TB.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. Um método fenotípico direto para teste de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* foi desenvolvido com base nos princípios do método das proporções e do exame de cultura pelo método de Ogawa – Kudoh. Este método foi padronizado com um swab comercial e o meio de cultura Ogawa-Kudoh, sem diluir a amostra de escarro espontâneo e com leitura entre 21 e 28 dias, para os fármacos isoniazida, rifampicina e estreptomicina, nas respectivas concentrações de 0,2 µg/mL, 40,0 µg/mL e 10,0 µg/mL, com simultânea identificação pelo ácido para-nitrobenzóico na concentração de 500,0 µg/mL;
2. O etambutol, nas concentrações de 2,0 µg/mL e 2,5 µg/mL, e a estreptomicina, na concentração de 4,0 µg/mL, demonstraram baixa atividade no meio Ogawa-Kudoh, devido ao baixo pH deste meio que degradou esses fármacos;
3. A concordância do método desenvolvido e padronizado para o swab comercial, em meio de cultura Ogawa-Kudoh contendo separadamente 0,2 µg/mL de isoniazida, 40,0 µg/mL de rifampicina, 10,0 µg/mL de estreptomicina e 500,0 µg/mL de ácido para-nitrobenzóico, com inoculação da amostra de escarro de forma direta, ou seja, sem diluir e leitura/interpretação do resultado do teste no período entre 21 e 28 dias, realizado a partir de amostras de escarro provenientes de pacientes com TB pulmonar foi muito boa quando comparado com o teste de sensibilidade a antimicrobianos no sistema MGIT;
4. A contaminação encontrada foi considerada aceitável, não representando um obstáculo para realização do método;
5. Uma possível limitação deste teste se dá no caso de amostras paucibacilares, o que exige uma orientação adequada ao paciente para a coleta de uma amostra de escarro de boa qualidade;
6. Diante desses resultados promissores, acreditamos que o método desenvolvido apresente um grande potencial para ser utilizado em laboratórios com pouca infra-estrutura, por ser de baixo custo, fácil execução e fornecer resultados em

cerca de 3 semanas (ou seja, antes da primeira consulta mensal após o início do tratamento do paciente).

Perspectivas

8. PERSPECTIVAS

Realizar um estudo multicêntrico com um maior número de amostras para validar o método desenvolvido em rotinas dos laboratórios da rede pública de saúde do país. Além disso, testar novas concentrações do antimicrobiano EMB no meio de cultura O-K para determinar a concentração crítica que iniba os isolados sensíveis e ao mesmo permita o crescimento dos isolados resistentes de Mtb.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research**. 1st ed. London: Chapman and Hall, 1991. 611 p.

ANASTASIOU, E. e MITCHELL, P. D. Paleopathology and genes: investigating the genetics of infectious diseases in excavated human skeletal remains and mummies from past populations. **Gene**, Jun 19. 2013.

ANGEBY, K. A., KLINTZ, L. e HOFFNER, S. E. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis with a nitrate reductase assay. **J Clin Microbiol**, v.40, n.2, Feb, p.553-555. 2002.

BANADA, P. P., SIVASUBRAMANI, S. K., BLAKEMORE, R., BOEHME, C., PERKINS, M. D., FENNELLY, K. e ALLAND, D. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. **J Clin Microbiol**, v.48, n.10, Oct, p.3551-3557. 2010.

BÍBLIA, Livro do Deuteronômio. **A Bíblia Sagrada**: edição revista e corrigida na grafia simplificada. Trad. de: João Ferreira de Almeida. Rio de Janeiro: Imprensa Bíblica Brasileira, 1969. Deuteronômio 28, vers. 22. 304 p.

BLAKEMORE, R., STORY, E., HELB, D., KOP, J., BANADA, P., OWENS, M. R., CHAKRAVORTY, S., JONES, M. e ALLAND, D. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. **J Clin Microbiol**, v.48, n.7, Jul, p.2495-2501. 2010.

BLOOM, B. R. e MURRAY, C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, v.257, n.5073, Aug 21, p.1055-1064. 1992.

BOEHME, C. C., NABETA, P., HILLEMANN, D., NICOL, M. P., SHENAI, S., KRAPP, F., ALLEN, J., TAHIRLI, R., BLAKEMORE, R., RUSTOMJEE, R., MILOVIC, A., JONES, M., O'BRIEN, S. M., PERSING, D. H., RUESCH-GERDES, S., GOTUZZO,

E., RODRIGUES, C., ALLAND, D. e PERKINS, M. D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **N Engl J Med**, v.363, n.11, Sep 9, p.1005-1015. 2010.

BUSH, M. T., DICKINSON, H. L., WARD, C. B. e AVERY, R. C. Antibiotic substances active against M. tuberculosis. **J Pharmacol Exp Ther**, v.85, Nov, p.237-246. 1945.

BWANGA, F., HOFFNER, S., HAILE, M. e JOLOBA, M. L. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. **BMC Infect Dis**, v.9, p.67. 2009.

CANETTI, G., FROMAN, S., GROSSET, J., HAUDUROY, P., LANGEROVA, M., MAHLER, H. T., MEISSNER, G., MITCHISON, D. A. e SULA, L. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. **Bull World Health Organ**, v.29, p.565-578. 1963.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.55, n.11, Mar 24, p.301-305. 2006.

CHAIYASIRINROJE, B., AUNG, M. N., MOOLPHATE, S., KASETJAROEN, Y., RIENTHONG, S., RIENTHONG, D., NAMPAISAN, O., NEDSUWAN, S., SANGCHUN, W., SURIYON, N., MITARAI, S. e YAMADA, N. Prospective evaluation of simply modified MODS assay: an effective tool for TB diagnosis and detection of MDR-TB. **Infect Drug Resist**, v.5, p.79-86. 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. CLSI document M100-S15. USA, v.25, n.1. 2005.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard**. CLSI document - M24-A2. USA, v. 31, n. 5. 2011.

CORONEL, J., ROPER M., CAVIEDES L., MOORE D. MODS. **A user guide. Microscopic-observation drug-susceptibility assay**. Lima, 2008. Disponível em: <http://www.modsperu.org/MODS_user_guide.pdf>. Acesso em: 25 de julho de 2013.

CROFTON, J. Chemotherapy of pulmonary tuberculosis. **Br Med J**, v.1, n.5138, Jun 27, p.1610-1614. 1959.

DIACON, A. H., VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F. e DONALD, P. R. From magic mountain to table mountain. **Swiss Med Wkly**, v.142, p.w13665. 2012.

DINI, C. e BIANCHI, A. The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. **Ann Ist Super Sanita**, v.48, n.3, p.319-327. 2012.

DUFFY, J. Social impact of disease in the late nineteenth century. **Bull N Y Acad Med**, v.47, n.7, Jul, p.797-810. 1971.

EDWARDS, K. J., METHERELL, L. A., YATES, M. e SAUNDERS, N. A. Detection of rpoB mutations in Mycobacterium tuberculosis by biprobe analysis. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, Sep, p.3350-3352. 2001.

ESPASA, M., GONZALEZ-MARTIN, J., ALCAIDE, F., ARAGON, L. M., LONCA, J., MANTEROLA, J. M., SALVADO, M., TUDO, G., ORUS, P. e COLL, P. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.6, Jun, p.860-865. 2005.

FENG, Y., LIU, S., WANG, Q., WANG, L., TANG, S., WANG, J. e LU, W. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using genotype MTBDRsl assay: a meta-analysis. **PLoS One**, v.8, n.2, p.e55292. 2013.

FLEMING, A. Louis Pasteur. **Br Med J**, v.1, n.4502, Apr 19, p.517-522. 1947.

FORRELLAD, M. A., KLEPP, L. I., GIOFFRE, A., SABIO Y GARCIA, J., MORBIDONI, H. R., DE LA PAZ SANTANGELO, M., CATALDI, A. A. e BIGI, F. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v.4, n.1, Jan 1, p.3-66. 2013.

FOX, G. J., BARRY, S. E., BRITTON, W. J. e MARKS, G. B. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v.41, n.1, Jan, p.140-156. 2013.

HART, P. D. Chemotherapy of tuberculosis; research during the past 100 years. **Br Med J**, v.2, n.4482, Nov 30, p.805; passim. 1946.

HAZBON, M. H. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. **Biomedica**, v.24 Supp 1, Jun, p.149-162. 2004.

HELB, D., JONES, M., STORY, E., BOEHME, C., WALLACE, E., HO, K., KOP, J., OWENS, M. R., RODGERS, R., BANADA, P., SAFI, H., BLAKEMORE, R., LAN, N. T., JONES-LOPEZ, E. C., LEVI, M., BURDAY, M., AYAKAKA, I., MUGERWA, R. D., MCMILLAN, B., WINN-DEEN, E., CHRISTEL, L., DAILEY, P., PERKINS, M. D., PERSING, D. H. e ALLAND, D. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. **J Clin Microbiol**, v.48, n.1, Jan, p.229-237. 2010.

HERSHKOVITZ, I., DONOGHUE, H. D., MINNIKIN, D. E., BESRA, G. S., LEE, O. Y., GERNAEY, A. M., GALILI, E., ESHED, V., GREENBLATT, C. L., LEMMA, E., BARGAL, G. K. e SPIGELMAN, M. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS One**, v.3, n.10, p.e3426. 2008.

HUANG, T. S., LEE, S. S., TU, H. Z., HUANG, W. K., CHEN, Y. S., HUANG, C. K., WANN, S. R., LIN, H. H. e LIU, Y. C. Use of MGIT 960 for rapid quantitative measurement of the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex to ciprofloxacin and ethionamide. **J Antimicrob Chemother**, v.53, n.4, Apr, p.600-603. 2004.

JACOBSON, K. R., TIERNEY, D. B., JEON, C. Y., MITNICK, C. D. e MURRAY, M. B. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v.51, n.1, Jul 1, p.6-14. 2010.

JAIN, A. e DIXIT, P. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? **J Biosci**, v.33, n.4, Nov, p.605-616. 2008.

JAIN, P., HARTMAN, T. E., EISENBERG, N., O'DONNELL, M. R., KRIAKOV, J., GOVENDER, K., MAKUME, M., THALER, D. S., HATFULL, G. F., STURM, A. W., LARSEN, M. H., MOODLEY, P. e JACOBS, W. R., JR. ϕ^2 GFP10, a high-intensity fluorophage, enables detection and rapid drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum samples. **J Clin Microbiol**, v.50, n.4, Apr, p.1362-1369. 2012.

JAIN, P., THALER, D. S., MAIGA, M., TIMMINS, G. S., BISHAI, W. R., HATFULL, G. F., LARSEN, M. H. e JACOBS, W. R. Reporter phage and breath tests: emerging phenotypic assays for diagnosing active tuberculosis, antibiotic resistance, and treatment efficacy. **J Infect Dis**, v.204 Suppl 4, Nov 15, p.S1142-1150. 2011.

JENKINS, H. E., PLESCA, V., CIOBANU, A., CRUDU, V., GALUSCA, I., SOLTAN, V., SERBULENCO, A., ZIGNOL, M., DADU, A., DARA, M. e COHEN, T. Assessing spatial heterogeneity of MDR-TB in a high burden country. **Eur Respir J**, Oct 25. 2012.

KAPPELMAN, J., ALCICEK, M. C., KAZANCI, N., SCHULTZ, M., OZKUL, M. e SEN, S. First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. **Am J Phys Anthropol**, v.135, n.1, Jan, p.110-116. 2008.

KATO-MAEDA, M., BIFANI, P. J., KREISWIRTH, B. N. e SMALL, P. M. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Invest**, v.107, n.5, Mar, p.533-537. 2001.

KEERS, R. Y. The gold rush 1925-35. **Thorax**, v.35, n.12, Dec, p.884-889. 1980.

KENT, P. T., KUBICA G. P. **Public Health Mycobacteriology – A Guide for Level III Laboratory**. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985. (publication nº PB 86-216546)

KNIGHT, F. I. Indications and Contra-indications for Altitude in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **Trans Am Climatol Assoc Meet**, v.5, p.50-54. 1888.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose [The aetiology of Tuberculosis]. **Berl Klin Wschr**, v.19, p.221-230. 1882.

KRUUNER, A., YATES, M. D. e DROBNIEWSKI, F. A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.44, n.3, Mar, p.811-818. 2006.

KUDOH, S. e KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull World Health Organ**, v.51, n.1, p.71-82. 1974.

LOIEZ-DUROCHER, C., VACHEE, A. e LEMAITRE, N. [Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: diagnostic methods]. **Ann Biol Clin (Paris)**, v.58, n.3, May-Jun, p.291-297. 2000.

MA, Z., LIENHARDT, C., MCILLERON, H., NUNN, A. J. e WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v.375, n.9731, Jun 12, p.2100-2109. 2010.

MADISON, B., ROBINSON-DUNN, B., GEORGE, I., GROSS, W., LIPMAN, H., METCHOCK, B., SLOUTSKY, A., WASHABAUGH, G., MAZUREK, G. e RIDDERHOF, J. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by agar proportion and radiometric methods. **J Clin Microbiol**, v.40, n.11, Nov, p.3976-3979. 2002.

MARKOE, R. C. Modern Methods in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **J Natl Med Assoc**, v.26, n.4, Nov, p.159-163. 1934.

MCNERNEY, R., MAEURER, M., ABUBAKAR, I., MARAIS, B., MCHUGH, T. D., FORD, N., WEYER, K., LAWN, S., GROBUSCH, M. P., MEMISH, Z., SQUIRE, S. B., PANTALEO, G., CHAKAYA, J., CASENGHI, M., MIGLIORI, G. B., MWABA, P., ZIJENAH, L., HOELSCHER, M., COX, H., SWAMINATHAN, S., KIM, P. S., SCHITO, M., HARARI, A., BATES, M., SCHWANK, S., O'GRADY, J., PLETSCHETTE, M., DITUI, L., ATUN, R. e ZUMLA, A. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. **J Infect Dis**, v.205 Suppl 2, May 15, p.S147-158. 2012.

MELZER, M. An automated molecular test for Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin (Xpert MTB/RIF) is sensitive and can be carried out in less than 2 h. **Evid Based Med**, v.16, n.1, Feb, p.19. 2011.

MIGLIORI, G. B., CENTIS, R., D'AMBROSIO, L., SPANEVELLO, A., BORRONI, E., CIRILLO, D. M. e SOTGIU, G. Totally drug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis: the same disease? **Clin Infect Dis**, v.54, n.9, May, p.1379-1380. 2012.

MIGLIORI, G. B., DE IACO, G., BESOZZI, G., CENTIS, R. e CIRILLO, D. M. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. **Euro Surveill**, v.12, n.5, May, p.E070517 070511. 2007a.

MIGLIORI, G. B., LODDENKEMPER, R., BLASI, F. e RAVIGLIONE, M. C. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is

"science" enough to tackle the epidemic? **Eur Respir J**, v.29, n.3, Mar, p.423-427. 2007b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1ª ed. Brasília, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

MITCHISON, D. A. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. **Am J Respir Crit Care Med**, v.171, n.7, Apr 1, p.699-706. 2005.

MITCHISON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.2, n.1, Jan, p.10-15. 1998.

MORGAN, M., KALANTRI, S., FLORES, L. e PAI, M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis**, v.5, p.62. 2005.

PALACI, M., PERES, R. L., MAIA, R., CUNHA, E. A., RIBEIRO, M. O., LECCO, R., DE SOUZA RIBEIRO, C., FERRO, E. SILVA R. R., VINHAS, S. A., DIETZE, R., VIANNA, S. e DE MORAIS, C. G. Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.17, n.6, Jun, p.782-786. 2013.

PALOMINO, J. C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.12, n.3, May, p.172-178. 2006.

PASMAN, L. The complication of coinfection. **Yale J Biol Med**, v.85, n.1, Mar, p.127-132. 2012.

PAWLOWSKI, A., JANSSON, M., SKOLD, M., ROTTENBERG, M. E. e KALLENIIUS, G. Tuberculosis and HIV co-infection. **PLoS Pathog**, v.8, n.2, Feb, p.e1002464. 2012.

PEARSON, S. V. The Role of the Sanatorium in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **Postgrad Med J**, v.3, n.35, Aug, p.193-197. 1928.

PERES, R. L., PALACI, M., LOUREIRO, R. B., DIETZE, R., JOHNSON, J. L., GOLUB, J. E., RUFFINO-NETTO, A. e MACIEL, E. L. Evaluation of oral antiseptic rinsing before sputum collection to reduce contamination of mycobacterial cultures. **J Clin Microbiol**, v.49, n.8, Aug, p.3058-3060. 2011.

PIATEK, A. S., TYAGI, S., POL, A. C., TELENTI, A., MILLER, L. P., KRAMER, F. R. e ALLAND, D. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Biotechnol**, v.16, n.4, Apr, p.359-363. 1998.

PONTALI, E., MATTEELLI, A. e MIGLIORI, G. B. Drug-resistant tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.19, n.3, May, p.266-272. 2013.

RIVAS, C., COITINHO, C., DAFOND, V., CORBO, M. e BALDJIAN, M. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. **Rev Argent Microbiol**, v.42, n.2, Apr-Jun, p.87-90. 2010.

RONDON, L., PIURI, M., JACOBS, W. R., JR., DE WAARD, J., HATFULL, G. F. e TAKIFF, H. E. Evaluation of fluoromycobacteriophages for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.49, n.5, May, p.1838-1842. 2011.

SADUSK, J. F., SWIFT, W. E., FALCO, E. e VADNEY, J. Sensitivity of the Tubercle Bacillus to Streptomycin before and during Specific Therapy. **J Clin Invest**, v.27, n.2, Mar, p.278-282. 1948.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v.37, n.4, Apr, p.246-251. 1982.

SANDGREN, A., STRONG, M., MUTHUKRISHNAN, P., WEINER, B. K., CHURCH, G. M. e MURRAY, M. B. Tuberculosis drug resistance mutation database. **PLoS Med**, v.6, n.2, Feb 10, p.e2. 2009.

SARIBAS, Z., YURDAKUL, P., ALP, A. e GUNALP, A. Use of fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.9, n.2, Feb, p.181-187. 2005.

SHINNICK, T. M. e GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.13, n.11, Nov, p.884-901. 1994.

SKRAHINA, A., HUREVICH, H., ZALUTSKAYA, A., SAHALCHYK, E., ASTRAUKO, A., VAN GEMERT, W., HOFFNER, S., RUSOVICH, V. e ZIGNOL, M. Alarming levels of drug-resistant tuberculosis in Belarus: results of a survey in Minsk. **Eur Respir J**, v.39, n.6, Jun, p.1425-1431. 2012.

STOP TB PARTNERSHIP. **The Global Plan To Stop TB 2011 – 2015**. Geneva, 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500340_eng.pdf>. Acesso em: 14 de julho de 2013.

SUSEMIHL, M. A. A. M. M., FERRAZOLI, L., UEKI, S.Y.M., GIMENEZ, R. D. e PALACI, M. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. **Rev Bras Patol Clín**, v.29, n.2, Abr-Jun, p.51-54. 1993.

TAKAKURA, S., TSUCHIYA, S., FUJIHARA, N., KUDO, T., IINUMA, Y., MITARAI, S., ICHIYAMA, S., YASUKAWA, K. e ISHIGURO, T. Isothermal RNA sequence amplification method for rapid antituberculosis drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.43, n.5, May, p.2489-2491. 2005.

TAMURA, M. e TAKANO, S. [Effects of pH of media on the minimal inhibitory concentration of D-ethambutol on Mycobacterium Tuberculosis]. **Kekkaku**, v.44, n.1, Jan, p.19-23. 1969.

TANOUE, S., MITARAI, S. e SHISHIDO, H. Comparative study on the use of solid media: Lowenstein-Jensen and Ogawa in the determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. **Tuberculosis (Edinb)**, v.82, n.2-3, p.63-67. 2002.

UDWADIA, Z. F., AMALE, R. A., AJBANI, K. K. e RODRIGUES, C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. **Clin Infect Dis**, v.54, n.4, Feb 15, p.579-581. 2012.

VAN RIE, A., PAGE-SHIPP, L., SCOTT, L., SANNE, I. e STEVENS, W. Xpert(®) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? **Expert Rev Mol Diagn**, v.10, n.7, Oct, p.937-946. 2010.

VARELDZIS, B. P., GROSSET, J., DE KANTOR, I., CROFTON, J., LASZLO, A., FELTEN, M., RAVIGLIONE, M. C. e KOCHI, A. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. **Tuber Lung Dis**, v.75, n.1, Feb, p.1-7. 1994.

VARMA-BASIL, M., EL-HAJJ, H., COLANGELI, R., HAZBON, M. H., KUMAR, S., BOSE, M., BOBADILLA-DEL-VALLE, M., GARCIA, L. G., HERNANDEZ, A., KRAMER, F. R., OSORNIO, J. S., PONCE-DE-LEON, A. e ALLAND, D. Rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from India and Mexico by a molecular beacon assay. **J Clin Microbiol**, v.42, n.12, Dec, p.5512-5516. 2004.

VELAYATI, A. A., MASJEDI, M. R., FARNIA, P., TABARSI, P., GHANAVI, J., ZIAZARIFI, A. H. e HOFFNER, S. E. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. **Chest**, v.136, n.2, Aug, p.420-425. 2009.

VICTOR, T. C. e VAN HELDEN, P. D. Detection of Mutations in Mycobacterium tuberculosis by a Dot Blot Hybridization Strategy. **Methods Mol Med**, v.54, p.155-164. 2001.

WELLS, C. D., CEGIELSKI, J. P., NELSON, L. J., LASERSON, K. F., HOLTZ, T. H., FINLAY, A., CASTRO, K. G. e WEYER, K. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. **J Infect Dis**, v.196 Suppl 1, Aug 15, p.S86-107. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System**. Genebra, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501545_eng.pdf>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2012**. Geneva, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/2009/surveillance_guidelines/en/index.html>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part III: Culture**. Geneva, 1998. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_\(part3\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_(part3).pdf)>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multidrug and Extensively Drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response**. Geneva, 2010a. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes**. 4th ed. Geneva, 2010b. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/tb_treatmentguidelines/en/>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

YU, X., JIANG, G., LI, H., ZHAO, Y., ZHANG, H., ZHAO, L., MA, Y., COULTER, C. e HUANG, H. Rifampin stability in 7H9 broth and Lowenstein-Jensen medium. **J Clin Microbiol**, v.49, n.3, Mar, p.784-789. 2011.

ZHANG, Y. e MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.7, n.1, Jan, p.6-21. 2003.

ZHANG, Y. e YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.13, n.11, Nov, p.1320-1330. 2009.

ZUMLA, A. The white plague returns to London--with a vengeance. **Lancet**, v.377, n.9759, Jan 1, p.10-11. 2011.

ZUMLA, A., ABUBAKAR, I., RAVIGLIONE, M., HOELSCHER, M., DITIU, L., MCHUGH, T. D., SQUIRE, S. B., COX, H., FORD, N., MCNERNEY, R., MARAIS, B., GROBUSCH, M., LAWN, S. D., MIGLIORI, G. B., MWABA, P., O'GRADY, J., PLETSCHETTE, M., RAMSAY, A., CHAKAYA, J., SCHITO, M., SWAMINATHAN, S., MEMISH, Z., MAEURER, M. e ATUN, R. Drug-resistant tuberculosis--current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs. **J Infect Dis**, v.205 Suppl 2, May 15, p.S228-240. 2012.

ZUMLA, A., MWABA, P., HUGGETT, J., KAPATA, N., CHANDA, D. e GRANGE, J. Reflections on the white plague. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.3, Mar, p.197-202. 2009.

ZUMLA, A., RAVIGLIONE, M., HAFNER, R. e VON REYN, C. F. Tuberculosis. **N Engl J Med**, v.368, n.8, Feb 21, p.745-755. 2013.